UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Estudio integral del rol de la selección en el proceso de especiación de los capuchinos del sur del género *Sporophila*

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

María Cecilia Estalles

Director de tesis: Dr. Darío Alejandro Lijtmaer

Consejero de estudios: Dr. Pablo Luis Tubaro

Lugar de trabajo: División Ornitología, Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2022

Estudio integral del rol de la selección en el proceso de especiación de los capuchinos del sur del género *Sporophila*

RESUMEN

El modelo de especiación alopátrica ha sido históricamente el principal para explicar la diversificación biológica. Sin embargo, la genómica ha revelado que la especiación con flujo génico es mucho más frecuente de lo que se suponía, tomando así nueva relevancia el rol de la selección (natural y sexual) en el proceso. Con el objetivo de analizar el rol de la selección durante su diversificación, en esta tesis se estudiaron los capuchinos del sur del género *Sporophila*, una radiación continental reciente de 10 especies de aves que se reproducen en los pastizales sudamericanos con un alto grado de simpatría, y que difieren en su coloración y vocalizaciones, pero genómicamente solo se diferencian en pocas regiones asociadas (generalmente) con la melanogénesis. Se seleccionaron cuatro especies: *S. hypoxantha*, *S. ruficollis*, *S. palustris* (tres especies cuya coloración sólo difiere en el parche de la garganta) y *S. iberaensis* (una especie recientemente descripta, simpátrica con las tres primeras). Se desarrollaron contrastes de genomas completos entre las especies, asociaciones fenotipo-genotipo (GWAS) y análisis de vocalizaciones en distintos escenarios de simpatría y alopatría. Entre los resultados más destacables se encontró: a) que las especies que solo difieren en el color de su garganta son las que tienen menor divergencia genómica dentro del grupo de los capuchinos, b) que las diferencias ocurren principalmente en las regiones regulatorias de los genes de la melanogénesis, c) que si bien cada región del genoma puede asociarse con varios parches de plumaje, la coloración de cada parche depende de una combinación única de genes y d) que existen diferencias vocales entre y dentro de cada especie que serían consecuencia de procesos de desplazamiento y/o convergencia de variables del canto en distintos escenarios de simpatría y alopatría local. Estos resultados permiten comprender varios aspectos de esta radiación adaptativa explosiva, el rol de la selección sexual y los mecanismos moleculares y comportamentales subyacentes.

PALABRAS CLAVE: *Sporophila*, capuchinos del sur, radiación adaptativa, especiación, selección sexual, flujo génico, genomas completos, GWAS, patrones de coloración, vocalizaciones, desplazamiento de caracteres, convergencia de caracteres.

Comprehensive study of the role of sexual selection in the southern capuchinos (genus *Sporophila*)

ABSTRACT

Historically, the allopatric speciation mechanism has been the main model to explain biological diversification processes. However, genomic data revealed that speciation with gene flow is much more frequent than previously thought, giving new relevance to the role of selection (natural and sexual) during these processes. To analyze the role of selection during diversification, in this thesis I studied the southern capuchinos of the genus *Sporophila*, a recent continental radiation of 10 bird species that breed in South American grasslands with a high degree of sympatry. These species differ in their coloration and vocalizations, but genetically only vary in few regions associated (generally) with melanogenesis. Four species were selected: *S. hypoxantha*, *S. ruficollis*, *S. palustris* (three species which coloration only differs in the throat patch) and *S. iberaensis* (a recently described species, sympatric with the other three). I performed genome-wide contrasts between species, genotype-phenotype associations (GWAS), and vocalization analyses under different scenarios of sympatry and allopatry. Among the most remarkable results, I found: a) that the species that only differ in their throat coloration are the most similar genetically within the capuchinos, b) that the genomic differences occur mostly in regulatory regions of melanogenesis genes, c) that although each region of the genome can be associated with several plumage patches, the coloration of each patch depends on a unique combination of genes and d) that there are vocal differences (between and within each species) that might be consequence of displacement and/or convergence processes of song variables in different scenarios of local sympatry and allopatry. These results shed light to several aspects of this explosive adaptive radiation, the role of sexual selection and the underlying molecular and behavioral mechanisms.

KEY WORDS: *Sporophila*, southern capuchinos, adaptive radiation, speciation, sexual selection, gene flow, whole genomes, GWAS, coloration patterns, vocalizations, character displacement, character convergence.

AGRADECIMIENTOS

A Darío Lijtmaer y Pablo Tubaro quienes me dieron la oportunidad de realizar un doctorado en la División Ornitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN). Muchas gracias por confiarme este maravilloso proyecto. Espero que estén satisfechos con mi desempeño.

A Darío Lijtmaer, mi director de tesis. Agradezco especialmente sus consejos, sus palabras de aliento, su infinita paciencia y su contagioso optimismo. Gracias también por incentivarme a soñar en grande y por apoyarme en mis proyectos e ideas.

A Leonardo Campagna. Agradezco su gran generosidad, su empatía y su incondicional apoyo y guía durante el camino. Gracias por enseñarme tanto y por compartir conmigo tu fascinación por los capuchinos.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN, UBA) por brindarme el contexto académico para desarrollar mi doctorado y a la División de Ornitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (MACN) por ofrecerme el mejor de los lugares de trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i) por otorgarme una beca que me permitió realizar el doctorado.

A las instituciones que apoyaron económicamente la investigación desarrollada en esta tesis: CONICET, Agencia I+D+i, National Science Foundation, Fundación Lounsbery, Ministerio de Educación de la Nación Argentina y Comisión Fulbright, Association of Field Ornithologists.

A los museos e instituciones que colaboraron con muestras de tejido y plumas: Field Museum, Louisiana State University Museum of Natural Science, Museo Nacional de Historia Natural de Uruguay, Fundación Temaikèn y Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Argentina por concederme los permisos de importación y exportación. A la Administración de Parques Nacionales y a las autoridades de Fauna de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos y Salta por otorgarme los permisos de colecta y las guías de tránsito.

A mis compañeros de la División de Ornitología del MACN con quienes he tenido el honor y la alegría de compartir estos años de doctorado: Yolanda Davies, Belén Bukowski, Priscila Hanisch, Laura Barone, Elisabet Vilacoba, Cássia Alves Lima Rezende, Natalí Attiná, Pablo Lavinia, Natalia Trujillo-Arias, María José Rodriguez Cajarville, Lucila Chifflet, Martín Carboni, Agustín Casale, Ezequiel Núñez Bustos, Ana Barreira, Natalia García, Sebastián Cabanne, Pablo Fracas, Silvia Martinez, Bárbara Delgado y Romina Gallenti. Agradezco también a los amigos de a otras divisiones: Sergio Lucero,

Daniella Teixeira, Willians Porto y Antonella Argoitia. Gracias muy especialmente a quienes me han escuchado y aconsejado dándome ánimos para seguir siempre adelante.

A los miembros del Fuller Evolutionary Biology Program, gracias por incluirme y recibirme con calidez durante mis visitas al Cornell Lab of Ornithology. Agradezco especialmente a Irby Lovette por su generosidad y a Bronwyn Butcher por su asistencia en el laboratorio.

A mis compañeros de campañas científicas y aventuras ornitológicas: María José Rodríguez-Cajarville, Laura Barone, Sergio Lucero, Elisabet Vilacoba, Elisabet Canale, y Soledad Valdecantos. Gracias por su entusiasmo, su alegría y su compromiso durante el trabajo de campo. Especialmente quiero agradecer a María José por sus enseñanzas sobre ornitología de campo y a Laura por estar siempre.

A las instituciones y personas que me facilitaron el trabajo de campo: Conservation Land Trust, observadores de aves de Entre Ríos, Ariel Rodríguez, Augusto Distel, Ana Peruyera, María del Carmen Estalles, miembros de Aves Argentinas de Mar Chiquita, propietarios y empleados de las zonas de muestreo.

A los investigadores que han enriquecido esta tesis a través de colaboraciones: Sheela Turbek, Karan Odom, Marcelo Araya-Salas, Luís Fábio Silveira, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito, Irby J. Lovette.

A María Teresa Reinoso-Perez, Callum McDiarmid, Alicia de la Colina, Page Muñiz, Luis Rossi, Susana Merani quienes me han ayudado en distintos momentos de la tesis.

A Ceci, Anto, Estefi, Lau, Mari, Ange, Pau, Pao y Marce. Gracias por hacer más divertidos y liviano mi camino con su linda amistad.

A mi mamá y a mi abuela por fortalecer mi corazón y cuidar mis sueños para que siempre tomen vuelo.

ÍNDICE

RESUMEN 2

ABSTRACT 3

AGRADECIMIENTOS 4

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL 10

1.1. DESARROLLO DE LA TEORÍA EVOLUTIVA 10

1.2. EL ADVENIMIENTO DE LA ERA GENÓMICA Y EL CONSIGUIENTE CAMBIO EN EL PARADIGMA EVOLUTIVO 12

1.3. PROCESOS DE DIVERSIFICACIÓN EN EL NEOTRÓPICO Y UTILIZACIÓN DE MODELOS AVIANOS PARA SU INTERPRETACIÓN 14

1.4. MODELO DE ESTUDIO: LOS CAPUCHINOS DEL SUR DEL GÉNERO *SPOROPHILA* 17

1.5. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22

CAPÍTULO II. ANÁLISIS GENÓMICOS DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR 24

2.1. INTRODUCCIÓN 24

2.1.1. LOS PROCESOS DE DIVERGENCIA Y SU ARQUITECTURA GENÓMICA 24

2.1.2. RADIACIONES ADAPTATIVAS 26

2.1.3. LA HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR 27

PRIMERAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DE LA DIVERSIFICACIÓN DEL GRUPO 27

LOS GENOMAS COMPLETOS PERMITEN COMENZAR A COMPRENDER LOS PROCESOS Y MECANISMOS EVOLUTIVOS EN EL GRUPO 30

2.1.4. AMPLIACIÓN Y PROFUNDIZACIÓN DEL ESTUDIO DE LA DIVERGENCIA GENÓMICA DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR 32

2.1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO 34

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 35

2.2.1. MUESTREO Y CONJUNTO DE DATOS 35

2.2.2. DESCUBRIMIENTO DE VARIABLES 37

2.2.3. EXPLORACIÓN DE LAS REGIONES DE DIVERGENCIA 39

2.2.4. RELACIÓN ENTRE LA DIVERGENCIA GENOTÍPICA Y LA DIFERENCIACIÓN EN LA COLORACIÓN DEL PLUMAJE 40

2.3. RESULTADOS 42

2.3.1. DIFERENCIACIÓN DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR EN BASE A TODOS SUS SITIOS DIVERGENTES 42

2.3.2. CONTRASTES DE PARES DE ESPECIES: DIVERGENCIA GENÓMICA 43

2.3.3. CONTRASTES DE PARES DE ESPECIES: PICOS DE DIVERGENCIA GENÓMICA 44
2.3.4. DIFERENCIACIÓN DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR EN BASE LOS PICOS DE DIVERGENCIA GENÓMICA 49
2.3.5. EXPLORACIÓN DE LOS PICOS DE DIVERGENCIA ENCONTRADOS EN LOS CONTRASTES DE PARES DE ESPECIES DE LAS SIETE ESPECIES DE CAPUCHINOS 51
2.3.6. DISTRIBUCIÓN DE LOS SNPs CON VALORES DE *FST* ≥ 0,85 EN LOS PICOS DE DIVERGENCIA GENÓMICA QUE INVOLUCRARON A *S. RUFICOLLIS* Y *S. IBERAENSIS* 54
2.3.7. RELACIÓN ENTRE DIVERGENCIA GENOMICA Y DE COLORACIÓN EN LOS CAPUCHINOS 55
2.4. CONCLUSIONES 61
CAPITULO III. BASE GENÓMICA DE LOS PATRONES DE COLORACIÓN DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR Y SUS IMPLICANCIAS EVOLUTIVAS 68
3.1. INTRODUCCIÓN 68
3.1.1. LA COLORACIÓN Y SU ROL EN LOS EVENTOS DE ESPECIACIÓN 68
3.1.2. AVANCES EN LOS ESTUDIOS DE LA COLORACIÓN ANIMAL EN LA ERA GENÓMICA 68
3.1.3. DIVERGENCIA GENÓMICA DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR Y SU VINCULACIÓN CON LOS CARACTERES DE COLORACIÓN 70
3.1.4. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS) PARA INFERIR LA BASE GENÉTICA DE LOS PATRONES DE COLORACIÓN EN LOS CAPUCHINOS DEL SUR 71
3.1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO 72
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS 73
3.2.1. CUANTIFICACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PIGMENTOS EN LAS PLUMAS DE LOS CAPUCHINOS 73
3.2.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS) 74
3.3. RESULTADOS 77
3.3.1. LAS REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON LA COLORACIÓN DE LA GARGANTA VARÍAN SEGÚN EL COLOR DE LOS PARCHES DE PLUMAJE QUE SE COMPARAN 77
3.3.2. LA VARIACIÓN DE COLOR EN LA MAYORÍA DE LOS PARCHES DE PLUMAJE IMPLICA UNA COMBINACIÓN ÚNICA DE PICOS DE ASOCIACIÓN Y DEPENDE DEL TIPO DE PIGMENTO 82
3.3.3. LOS INDIVIDUOS CON GARGANTAS NEGRAS COMPARTEN GENOTIPOS EN LAS REGIONES GENÓMICAS QUE ESTÁN ASOCIADAS CON LA COLORACIÓN DE LA GARGANTA 89
3.3.4. LA MAYORÍA DE LOS CAMBIOS OCURREN EN REGIONES NO CODIFICANTES Y DIFERENTES ÁREAS DENTRO DE LAS MISMAS REGIONES CANDIDATAS CONTROLAN DIFERENTES PARCHES DE PLUMAJE 90
3.4. CONCLUSIONES 92

CAPÍTULO IV. DIFERENCIACIÓN Y VARIABILIDAD DE LAS VOCALIZACIONES DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR Y SUS POSIBLES CAUSAS 97
4.1. INTRODUCCIÓN 97
4.1.1. CARACTERES COMPORTAMENTALES COMO MECANISMOS DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO PRECIGÓTICO 97
4.1.2. RELEVANCIA DE LAS SEÑALES ACÚSTICAS EN LAS AVES 97
4.1.3. VARIABILIDAD DE LAS VOCALIZACIONES 98
4.1.4. DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES 100
4.1.5. LAS VOCALIZACIONES DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR 102
4.1.6. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO 103
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS 104
4.2.1. MUESTREO 104
4.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS GRABACIONES Y VARIABLES MEDIDAS 106
4.2.3. OBTENCIÓN DE MÉTRICAS DE CANTO 108
ESTIMACIÓN DE VARIABLES ACÚSTICAS A NIVEL DE ELEMENTOS 108
ESTIMACIÓN DE VARIABLES ACÚSTICAS A NIVEL DE CANTOS 108
REVISIÓN DE LOS DATASETS 108
4.2.4. PARÁMETROS ACÚSTICOS Y SU VARIACIÓN ENTRE ESPECIES Y POBLACIONES 112
4.2.5. ESTUDIO DE LOS ESPACIOS ACÚSTICOS DE LA POBLACIONES MUESTREADAS 113
4.2.6. EFECTO DE LA DISTANCIA GEOGRÁFICA SOBRE LAS VOCALIZACIONES DE LOS CAPUCHINOS 114
EFECTO SOBRE LAS VARIABLES ACÚSTICAS 114
EFECTO SOBRE EL SOLAPAMIENTO ACÚSTICO DE LAS POBLACIONES 114
4.3. RESULTADOS 115
4.3.1. CONSIDERACIONES SOBRE EL MUESTREO 115
4.3.2. REDUCCIÓN DE LA DIMENSIONALIDAD Y ORDENAMIENTO DE LAS ESPECIES Y POBLACIONES EN EL ESPACIO ACÚSTICO 116
ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES POR ESPECIE 116
ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES POR POBLACIÓN 118
4.3.3. DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES EN LAS VARIABLES ACÚSTICAS 120
CANTOS SIMPLES 120
CANTOS COMPLEJOS 122
4.3.4. DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES EN LAS VARIABLES ACÚSTICAS 124

CANTOS SIMPLES 124
CANTOS COMPLEJOS 128
4.3.5. VARIABLES ACÚSTICAS Y DISTANCIA GEOGRÁFICA 131
4.3.6. SOLAPAMIENTO DE LOS ESPACIOS ACÚSTICOS DE LAS POBLACIONES 133
4.4. DISCUSIÓN 135
4.4.1. LAS VOCALIZACIONES DE LAS CUATRO ESPECIES FOCALES Y SU DIFERENCIACIÓN 135
4.4.2. LA VARIABILIDAD DE LAS VOCALIZACIONES ENTRE LAS POBLACIONES 138
4.4.3. IMPLICANCIAS Y POSIBLES EXPLICACIONES DE LOS PATRONES HALLADOS 140
4.4.4. EFECTO DEL AISLAMIENTO GEOGRÁFICO: EL CASO DE LA POBLACIÓN DE SALTA DE *S. RUFICOLLIS*. 143
4.4.5. CONSIDERACIONES FINALES 144
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL 146
5.1 CONSIDERACIONES FINALES 153
BIBLIOGRAFÍA 155
APÉNDICE 174
CAPÍTULO II 174
CAPÍTULO IV 178

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. DESARROLLO DE LA TEORÍA EVOLUTIVA

En 1859 Charles Darwin publicó *El Origen de las Especies* estableciendo las bases de la teoría evolutiva actual. En su trabajo presentaba pruebas del origen único de la diversidad biológica a partir de un antepasado común que, bajo presiones de selección natural, habría acumulado cambios a través de generaciones ramificándose en diferentes organismos (Darwin 1859). A pesar de la amplia aceptación de esta teoría, aún hoy distamos de comprender completamente los mecanismos y procesos que dan lugar a la formación de nuevas especies, y es por ello por lo que su estudio continúa siendo un tópico fascinante y central sobre el que se sigue trabajando y debatiendo en biología evolutiva (Bolnick & Fitzpatrick 2007). En particular, se discute sobre la contribución relativa de los mecanismos de deriva genética y selección en dichos procesos, cuáles son los tipos de selección más comúnmente involucrados, cuan decisiva es la presencia de barreras geográficas (es decir la dicotomía entre especiación alopátrica y especiación simpátrica), cuál es la base genética de la especiación y qué patrones de cambio a nivel genómico la acompañan (Coyne & Orr 2004, Nosil & Schluter 2011, Ellegren et al 2012, Nosil & Feder 2012, 2013, Parchman et al. 2013, Poelstra et al. 2014, Lamichhaney et al. 2015, 2016).

A mediados del siglo XX la deriva génica cobró mayor protagonismo como mecanismo de especiación, relegando en cierto sentido a la selección natural propuesta inicialmente en la teoría evolutiva de Darwin. Durante este período, Dobzhansky (1937) y Muller (1940, 1942) postularon sus clásicos estudios sobre especiación en los que explicaban que la fijación de alelos diferentes en genes complementarios de poblaciones aisladas propicia el aislamiento reproductivo post-cigótico, conduciendo eventualmente a la formación de dos especies nuevas cuyos híbridos son estériles o inviables (**Figura 1.1**). Este modelo ha estado sujeto a un intenso debate y perfeccionamiento hasta dar lugar a lo que se conoce actualmente como teoría de la dominancia (ver revisión de Presgraves 2010), una teoría elemental en biología evolutiva que ha recibido un notorio soporte empírico en diversos grupos taxonómicos (Coyne & Orr, 1989, 1997, Sasa et al. 1998, Jiggins et al. 2001, Price & Bouvier 2002, Tubaro & Lijtmaer 2002, Lijtmaer et al. 2003, Arrieta et al. 2013, Macagno et al. 2020).

Al proporcionar un mecanismo genético convincente sobre la diferenciación entre poblaciones aisladas, los estudios de Dobzhansky (1937) y Muller (1940 y 1942) dieron sustento al modelo de

especiación alopátrica desarrollado por Mayr (1942). Mientras que bajo este modelo la especiación en alopatría es claramente posible (Mayr 1963), la especiación simpátrica es poco viable porque el flujo génico en dicho escenario sin poblaciones aisladas tendería a homogeneizar el contenido genético, evitando este proceso de diferenciación y desarrollo de incompatibilidades genéticas. Así, de acuerdo con el modelo de especiación alopátrica, los rangos solapados de especies hermanas observados en la actualidad son en realidad producto de contactos secundarios que han tenido lugar luego de que dichas especies especiaran en alopatría (Mayr 1963).

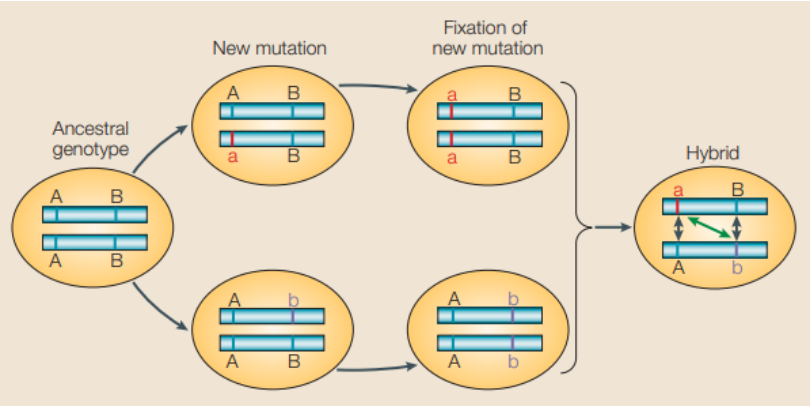


Figura 1.1: Esquema del modelo de incompatibilidad híbrida de Dobzhansky y Muller. Una población ancestral, cuyo genotipo para dos genes que interactúan es *AA BB*, se divide en dos poblaciones nuevas. Diferentes mutaciones pueden surgir en estas poblaciones: *A* muta y se transforma en *a* en una población y *B* en *b* en la otra. Luego de cierta cantidad de generaciones estas mutaciones se fijan, originando eventualmente nuevos genotipos (*aa BB* y *AA bb*) para cada población. Los híbridos son incompatibles porque la interacción *a-b* nunca ha existido en las poblaciones parentales. Las flechas negras representan procesos de divergencia y la flecha verde la incompatibilidad hibrida. Imagen tomada de Wu & Ting 2004.

En este contexto, la especiación simpátrica y parapátrica han sido mucho más controversiales, difíciles de comprobar y hasta consideradas como construcciones teóricas sin un correlato claro en la naturaleza, llegándose a plantear que el modelo de especiación alopátrica debería considerarse el "modelo nulo" de los procesos de diversificación (Futuyma & Mayer 1980, Felsenstein 1981, Coyne & Orr 2004; ver discusión en Bolnick & Fitzpatrick 2007). Así, durante décadas los modelos de especiación simpátrica y parapátrica se limitaron a casos puntuales, que de hecho incluían generalmente aislamiento genético en todas las etapas de divergencia, sin presencia de flujo génico. La especiación simpátrica encontró respaldo principalmente en varios sistemas vegetales en donde cambios en la ploidía cromosómica (originados por errores meióticos o eventos de hibridación) generan nuevas especies de manera casi instantánea (Ramsey & Schemske 1998, Rieseberg & Willis

2007, Wood et al. 2009). En modelos animales en cambio, las evidencias estaban circunscriptas a casos particulares que incluían: a) algunas especies parásitas en donde cambios en el hospedador generan aislamiento reproductivo (sobre todo si se reproducen o alimentan específicamente dentro del mismo; Berlocher & Feder 2002, Feder et al. 2003, Munday et al. 2004), b) especies de origen híbrido, aisladas de sus especies parentales por diferencias, por ejemplo, en su ploidía o ecología (Mavarez et al. 2006, Mallet et al. 2007, Hermansen et al. 2014, Barrera-Guzmán et al 2017) y c) radiaciones evolutivas en sitios aislados, como ocurre con algunas especies de peces cíclidos de lagos africanos y centroamericanos (Barluenga et al. 2006, Torres-Dowdall & Meyer 2021), o que implicaron una adaptación ecológica superadora, como sucede con los pinzones de Darwin (Grant & Grant 1979, Lamichhaney et al. 2015, 2016, 2018). Finalmente, la especiación parapátrica ha sido (y continúa siendo) aún menos estudiada que la simpátrica, habiendo muy pocos ejemplos de la misma. Entre ellos se encuentran: a) la especiación en "anillos de especies" de las aves del género *Phylloscopus* en Europa y Asia (Irwin et al. 2001; Martins et al. 2013) y b) las salamandras con especiación parapátrica en Norteamérica y el Neotrópico (Fisher-Reid et al. 2013, Rovito 2017).

Durante la segunda mitad del siglo XX, entonces, los estudios sobre historia evolutiva, y en particular diversificación y especiación, se realizaron bajo el paradigma de la especiación alopátrica, asumiendo en una notoria mayoría de los casos un rol central de las barreras geográficas en el proceso y el completo aislamiento entre las poblaciones durante su divergencia y eventual especiación.

1.2. EL ADVENIMIENTO DE LA ERA GENÓMICA Y EL CONSIGUIENTE CAMBIO EN EL PARADIGMA EVOLUTIVO

A principios del siglo XXI irrumpieron las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, que permiten un incremento exponencial en la cantidad de información que se puede obtener a partir del genoma de los organismos. Este avance tecnológico, acompañado por un mayor desarrollo de la teoría y análisis de datos de genética de poblaciones, ha brindado una oportunidad sin precedentes para estudiar la historia evolutiva de los organismos, y en particular el proceso de especiación. Uno de los resultados más sorprendentes ha sido la revelación de que el flujo génico durante los procesos de diversificación es mucho más común de lo que se pensaba tradicionalmente y está lejos de ser una excepción que ocurre en contadas ocasiones (Servedio et al. 2011, Feder et al. 2012, Martin et al. 2013, Poelstra et al. 2014, Lamichhaney et al. 2015, Oswald et al. 2017, Richards et al. 2019,

Winker 2021). Esta información es trascendental, ya que por mucho tiempo un dogma central en biología evolutiva fue que el flujo génico de un migrante entre poblaciones por generación era suficiente para impedir la diferenciación entre las mismas. Ante esta revolucionaria evidencia de la existencia de flujo génico durante el proceso evolutivo, uno de los principales desafíos de la biología evolutiva actual es comprender cómo ocurren de todos modos la diferenciación morfológica y ecológica, y especialmente el aislamiento reproductivo, sin que el genoma se homogeneice e impida la evolución independiente de los linajes (Getz et al. 2016, Ravinet et al. 2017, Foote 2018).

La evidencia genómica reunida en el contexto de este nuevo paradigma evolutivo señala que la especiación con flujo génico ocurre fundamentalmente cuando existen loci que actúan como barreras genéticas, reduciendo la tasa esperada de migración de genes entre poblaciones. Esto es posible principalmente cuando: a) hay regiones del genoma sin entrecruzamiento (por ejemplo por rearreglos cromosómicos) que contienen alelos vinculados a alguna adaptación ambiental local o al aislamiento reproductivo (Noor et al. 2001, Feder et al. 2003, Lowry et al. 2010, Zhang et al. 2021), o b) hay una fuerte presión de selección actuando sobre unos pocos loci (genes de especiación) que eventualmente conduce a la diferenciación del resto del genoma (por ejemplo por arrastre por ligamiento, o *genetic hitchhiking*; Nosil & Schluter 2011, Feder et al. 2012, Nosil & Feder 2012, Ravinet et al. 2017, Foote 2018). Esto muestra como este nuevo modelo esboza nuevos escenarios de especiación que revalorizan el rol de la selección, ya sea natural o sexual, sugiriendo que podría actuar junto a la deriva génica, o que incluso podría ser protagonista en momentos específicos de los procesos especiogénicos (Getz et al 2016, Foote 2018). En este contexto, la selección disruptiva tendría un papel fundamental al impulsar poblaciones de una misma especie en direcciones evolutivas independientes cuando, por ejemplo, favorece el uso diferencial de un recurso generando subpoblaciones especializadas en recursos diferentes (Van Rijssel et al. 2018, Whitney et al. 2018, Wang et al. 2020) o cuando actúa sobre caracteres sexuales esenciales para el emparejamiento selectivo (Van Rijssel et al. 2018, Kopp et al 2018).

Esta perspectiva en la que se contempla la diversificación con flujo génico ha impulsado la acumulación de una notable cantidad de conocimiento en un período relativamente corto de tiempo (Ravinet et al. 2017, Campbell et al 2018, Foote 2018). No obstante, es importante tener en cuenta que los estudios en esta temática recién están comenzando y que aún no se comprenden del todo diferentes aspectos de estos procesos como el efecto diferencial que ejerce el flujo entre

las poblaciones, como afectan las características de cada especie a los procesos de diferenciación (Feder et al. 2012, Nosil and Feder 2012, Smith et al. 2014, Naka & Brumfield 2018, Lavinia et al. 2019), cuál es la relevancia de la co-evolución mitonuclear (Hill 2015, 2017, Morales et al. 2018, Hill et al. 2019) y cuál es el rol de la hibridación, tanto por introgresión adaptativa (el traspaso de alelos beneficiosos de una especie a la otra; Hedrick 2013) como por especiación híbrida (Barrera-Guzmán et al 2017, Lamichhaney et al. 2018, Meier et al. 2018, Marques et al. 2019).

Más aún, la acumulación de estudios genómicos sobre los patrones de diversificación y especiación ha mostrado que no solamente nos falta comprender diversos aspectos de estos procesos en presencia de flujo génico, sino que además los mismos son mucho más diversos y complejos de lo que se pensaba (Ravinet et al. 2017, Foote 2018, Richards et al. 2019). Por ejemplo, cuando se reanalizaron las radiaciones de peces cíclidos de los lagos de África y Centroamérica (consideradas durante décadas modelos robustos de especiación simpátrica primaria), la evidencia genómica señaló que la historia evolutiva de cada radiación es variable y que contempla desde múltiples colonizaciones de los lagos hasta la divergencia en simpatría tras un contacto secundario (Malinsky et al. 2015, Martin et al. 2015, Kautt et al. 2016). Algo similar ocurre en el caso de los pinzones de Darwin, que contrariamente a los cíclidos han sido tomados tradicionalmente como un ejemplo de radiación adaptativa por especiación alopátrica en diferentes islas, pero los estudios genómicos han mostrado que la radiación en realidad ha involucrado casos de diferenciación en alopatría, otros casos que han presentado flujo génico entre islas o dentro de una misma isla, e incluso especiación híbrida (Lamichhaney et al 2105, 2016, 2018).

En base a estas complejidades e incertidumbres que aún persisten, la postura actual en los estudios de especiación no es concentrarse meramente en probar si la misma ocurre con o sin aislamiento geográfico (simpatría vs alopatría), sino tratar de comprender además en base a la estructura genómica hallada los procesos bajo los cuales la selección natural y la selección sexual originan nuevas especies en presencia de flujo génico (Foote 2018, Richards et al. 2019).

1.3. PROCESOS DE DIVERSIFICACIÓN EN EL NEOTRÓPICO Y UTILIZACIÓN DE MODELOS AVIANOS PARA SU INTERPRETACIÓN

El Neotrópico es la región más biodiversa del planeta. Este hecho, sumado a su topografía compleja y su contrastante variedad de ambientes, convierten a esta región en una de las más propicias e

interesantes para llevar a cabo estudios evolutivos (Stotz et al. 1996, Newton 2003). A pesar de esto, ha sido históricamente mucho menos estudiado que otras regiones menos diversas como, por ejemplo, el Neártico (Beheregaray 2008, Turchetto-Zolet et al. 2013, Reddy 2014, Lees et al. 2020).

Tal como ha ocurrido de manera más general y se ha discutido más arriba, el mecanismo de especiación alopátrica ha sido el modelo predilecto para explicar los procesos de especiación en el Neotrópico, relegándose así el estudio de la especiación parapátrica y simpátrica (Rull & Carnaval 2020). La gran diversidad de barreras geográficas (históricas y contemporáneas) presentes en el Neotrópico proveen escenarios ideales para suponer procesos de especiación en alopatría (Stotz et al. 1996, Newton 2003, Rull & Carnaval 2020). Así, los principales factores diversificadores propuestos para la región han sido justamente barreras geográficas: a) los ríos de cauce ancho, principalmente en la región amazónica (Ribas et al. 2012, Fernandes et al. 2012, Naka & Brumfield 2018, Kopuchian et al. 2020), b) la Cordillera de los Andes (Weir 2006, Brumfield & Edwards 2007, Sedano & Burns 2010, Weir & Price 2011, Valderrama et al. 2014), c) los corredores de vegetación abierta que separan la Selva Atlántica del complejo Yungas-Amazonía (Lavinia et al. 2015, 2019, Trujillo-Arias et al. 2017, Cabanne et al. 2019), y d) los hielos glaciales y las zonas que se encontraban entre los refugios de ambiente habitable durante las glaciaciones del fin del Plioceno y el Pleistoceno, siendo en el Neotrópico esto particularmente relevante en la región andino-patagónica (Weir 2006, Lessa et al. 2010, Lijtmaer et al. 2011, Sérsic et al. 2011). Sin embargo, el nuevo escenario evolutivo de diversificación con flujo génico nos exhorta a estudiar los procesos especiogénicos neotropicales desde una perspectiva renovada (Rull & Carnaval 2020), siendo fundamental analizar si hay efectivamente flujo génico en cada caso particular y evaluar la contribución relativa de la selección (natural y sexual) y de la deriva génica en las distintas etapas del proceso (Foote 2018).

Las aves constituyen un grupo taxonómico especialmente apropiado para estudiar los patrones evolutivos del Neotrópico. Por un lado, con alrededor de 3.400 especies (alrededor de un tercio de las especies del planeta) las aves son sumamente diversas en la región (Newton 2003, Jenkins 2013; **Figura 1.2**). Por otro lado, se trata de un grupo taxonómico ampliamente estudiado, siendo por lo tanto uno de los que mejor resuelta tiene su sistemática y taxonomía (aun cuando ambas son por supuesto dinámicas) y esto permite que no haya incertidumbres (por ejemplo, para establecer pares de especies hermanas) que constituyan un obstáculo en su estudio evolutivo. Es frecuente, por otro

lado, que cambios en su morfología, ecología y comportamiento puedan asociarse de manera directa con eventos de diversificación (Price 1998, Slabbekoorn & Smith 2002, Gomes et al. 2016, Price-Waldman et al. 2020), permitiendo estudiar dicha asociación. Por último, los mecanismos de aislamiento reproductivo post-cigótico (esterilidad e inviabilidad en los híbridos) se desarrollan particularmente lento en las aves y por ende tardan más tiempo que otros grupos animales en alcanzar un aislamiento completo entre las especies durante el proceso evolutivo (Price & Bouvier 2002, Lijtmaer et al. 2003). Debido a ello, durante las primeras etapas del proceso de especiación tienen particular relevancia los mecanismos de aislamiento reproductivo pre-cigótico, especialmente si el proceso ocurre en un contexto de barreras geográficas permeables o poblaciones en simpatría. Esto permite que al estudiar las etapas tempranas del proceso de especiación en las aves se pueda analizar el rol de dichos mecanismos de aislamiento reproductivo

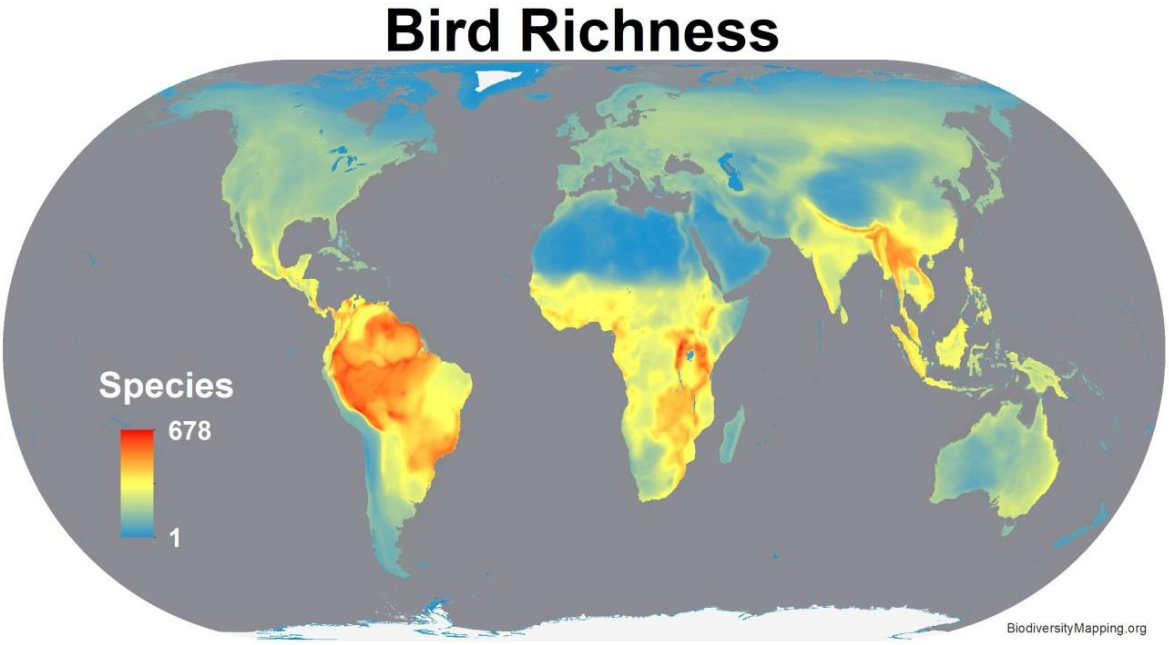


Figura 1.2: Mapa de la riqueza específica de aves del planeta. El mismo está basado en información provista por *BirdLife International and NatureServe* (2013). Se observa claramente la notoria diversidad de aves del Neotrópico en comparación con el resto del planeta. Imagen obtenida de *BiodiversityMapping.org*.

pre-cigótico, entre los que se destacan la coloración y las vocalizaciones, sabiendo que son la principal barrera al flujo génico entre las especies en formación. El estudio de estas señales posee indudablemente particular interés dado el cambio de paradigma evolutivo que se comenta más

arriba, en el cual establecer el grado de flujo génico durante el proceso temprano de especiación tiene una clara relevancia.

En este contexto, en esta tesis se estudia justamente el proceso de especiación en el Neotrópico a través del uso de las aves como modelo de estudio. En particular, se analiza el papel que han tenido la selección y los mecanismos de aislamiento reproductivo pre-cigóticos en la diversificación y consecuente radiación de los capuchinos del sur del género *Sporophila*, un grupo de 10 especies de aves semilleras que se distribuyen en los pastizales de Sudamérica y que como se detalla en la sección siguiente es particularmente relevante para el estudio del proceso y los mecanismos de especiación.

1.4. MODELO DE ESTUDIO: LOS CAPUCHINOS DEL SUR DEL GÉNERO *SPOROPHILA*

Los capuchinos del sur del género *Sporophila* (familia Thraupidae) son un grupo de 10 especies de aves semilleras (*S. bouvreuil*, *S. cinnamomea*, *S. hypochroma*, *S. hypoxantha*, *S. iberaensis, S. melanogaster*, *S. nigrorufa*, *S. palustris*, *S. pileata* y *S. ruficollis*) que se reproducen en los pastizales subtropicales de Sudamérica, al sur del río Amazonas (Lijtmaer et al 2004, Billerman et al. 2022). Una de las características sobresalientes del grupo es el alto nivel de simpatría entre sus especies (Billerman et al. 2022), tal como puede verse en la **Figura 1.3**. Debe destacarse de todos modos, que las especies poseen un grado de solapamiento variable, que confiere a las poblaciones de algunas de ellas diferentes condiciones locales de simpatría y alopatría. Esto es particularmente notorio, por ejemplo, en *S. hypoxantha* y *S. ruficollis*, que en algunas zonas están en alopatría con respecto al resto de las especies del grupo, pero en otras (noreste de Argentina) están en simpatría con hasta 4 ó 5 especies diferentes (**Figura 1.3**). Otras especies, en cambio, tienen rangos de distribución más restringidos y se encuentran en simpatría con otras especies a lo largo de toda su distribución, sin áreas de alopatría; tal es el caso por ejemplo de *S. palustris* y *S. hypochroma* (**Figura 1.3**). Debe mencionarse además que a la restringida distribución de algunas de las especies se suma el hecho de que la misma está disminuyendo en varios casos, principalmente por la pérdida de hábitat y el tráfico ilegal para mascotismo (Filloy el al. 2006, Vizentin-Bugoni et al. 2013, Galluppi-Selich & Clay 2018, Billerman et al. 2022).

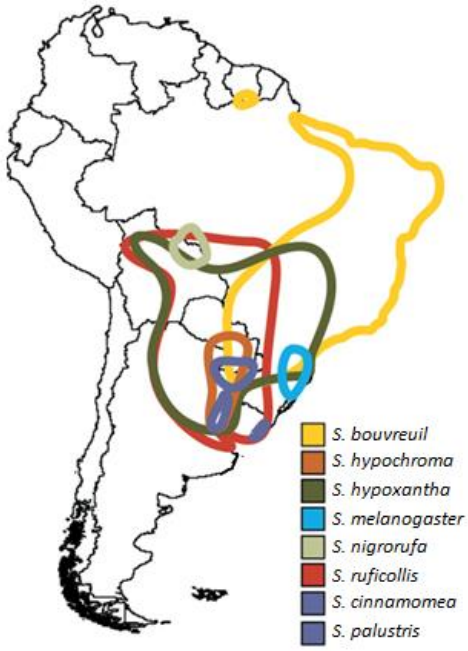


Figura 1.3: Distribución aproximada de los capuchinos del sur en el continente Sudamericano. Las distribuciones representadas se construyeron en base a información obtenida de Ridgely & Tudor (1989) y *BirdLife International* (2011). En el esquema la distribución de *S. bouvreuil* incluye tanto a la propia como la de *S. pileata*, ya que ambas especies eran consideradas como una sola al momento de su publicación. Por otro lado, *S. iberaensis* no figura ya que fue descripta como una especie en sí misma recién en 2016 (Di Giacomo & Kopuchian 2016). Imagen modificada a partir de Campagna et al. (2011).

Este grupo constituye una radiación evolutiva continental reciente y explosiva, de origen pleistocénico (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2012, 2013, 2015). Desde el punto de vista morfológico no difieren en sus medidas corporales (peso, largo o ancho del tarso, tamaño y forma del pico, envergadura, etc). Sin embargo, los machos adultos poseen claras diferencias en su coloración (Campagna et al 2012, **Figura 1 .4**) y en sus vocalizaciones (Campagna et al. 2012). Estos dos caracteres son fundamentales para el reconocimiento intraespecífico, tanto en las aves en general (e.g., Baker & Baker 1990, Uy et al. 2009) como presumiblemente en los capuchinos (Benites et al. 2015), y tal como se comenta más arriba constituyen los principales mecanismos de aislamiento reproductivo pre-cigótico en las aves. Las hembras, en cambio, son indistinguibles al ojo humano (todas poseen una coloración parda-olivácea similar; **Figura 1.4**) y solo es posible identificarlas cuando su coloración es inspeccionada usando espectrofotometría y modelos visuales avianos (Benites et al. 2010), o cuando se analizan sus vocalizaciones (Repenning & Fontana 2019).

A pesar de las diferencias que presentan en su coloración y su canto, estas especies poseen muy poca diferenciación en su ADN y de hecho carecen de monofilia recíproca al analizar marcadores genéticos neutros (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2010, 2012, 2013), incluso cuando se utilizan miles de marcadores aleatorios a través de técnicas de genómica (Campagna et al. 2015). Recientemente, análisis de genomas completos de algunas de las especies del grupo han confirmado que la divergencia genética entre los capuchinos es efectivamente muy baja (*Fst* ~0.008) y han mostrado que difieren en pocas regiones genómicas (Campagna et al. 2017). Dichas regiones, que han sido moldeadas por barridos selectivos recientes (Hejase et al. 2020), contienen genes asociados con la síntesis de melanina, que es justamente el pigmento responsable de la coloración en el grupo (Campagna et al. 2017).

Estos resultados en su conjunto sugieren que la radiación de los capuchinos no estaría ligada a mecanismos de aislamiento geográfico y posterior diferenciación en alopatría por deriva génica, ya que además de estar en una notoria simpatría, sus especies prácticamente no tienen divergencia genética neutra, hay unos pocos picos muy claros de diferenciación en el genoma y la diversificación y especiación ha sido muy rápida y reciente. En cambio, la radiación del grupo sería consecuencia de procesos de selección actuando sobre regiones específicas del genoma (Campagna et al. 2017). Particularmente, la similitud entre las especies en torno a sus características morfométricas y ecológicas, junto con el fuerte dimorfismo sexual que existe en el grupo (machos llamativos y diferentes entre sí y hembras muy similares e inconspicuas), sugieren que la selección sexual sería el principal motor de la diversificación en los capuchinos.

Como ha ocurrido con otros sistemas biológicos y se detalla más arriba, la revolución genómica ha proporcionado información reveladora en torno a la historia evolutiva de los capuchinos del sur. Sin embargo, lejos de haber puesto punto final a los interrogantes sobre los procesos de diversificación y especiación en el grupo, dicha información ha estimulado el surgimiento de nuevas y más ambiciosas preguntas, tales como la relación entre el grado de diferenciación genómico y fenotípico entre estas especies, que de por sí ya poseen escasas diferencias en su genoma, la base genómica fina de las diferencias en los patrones de coloración de las especies, el rol de las vocalizaciones (que han sido hasta ahora mucho menos estudiadas que el color) y su posible base genómica, y si existen diferencias atribuibles a la selección natural además de la sexual.

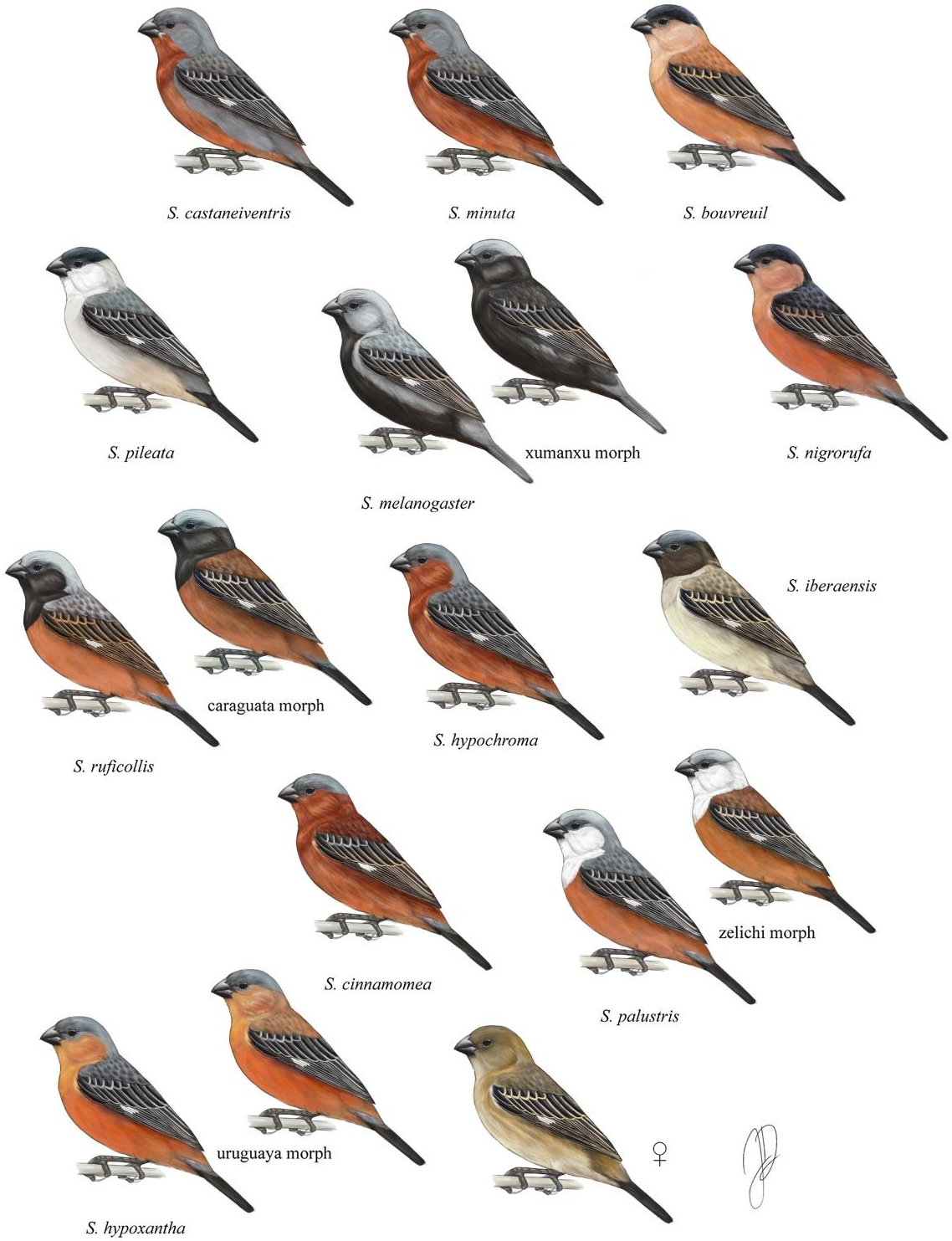


Figura 1.4: Capuchinos del sur del género *Sporophila*. Imagen ilustrativa de adultos de las diez especies de capuchinos del sur y sus cuatro morfos alternativos conocidos. Ilustración realizada por Jillian Ditner para Campagna et al. (2018).

Con el objetivo de responder algunas de estas preguntas, se seleccionaron para el proyecto de tesis cuatro especies de capuchinos (*S. hypoxantha*, *S. ruficollis*, *S. palustris* y *S. iberaensis*) que poseen características que las hacen particularmente apropiadas para esta tarea. En primer lugar, las tres primeras especies son las que menos se diferencian morfológicamente dentro de los capuchinos, difiriendo solo en el color de la garganta de los machos, que es color canela en *S. hypoxantha*, negra en *S. ruficollis* y blanca en *S. palustris*. Esto hace que la identificación de las áreas del genoma diferenciadas entre estas especies sea especialmente informativa en relación con los mecanismos de diferenciación del grupo y la base genética de los patrones de coloración observados en los machos, ya que permite establecer una asociación directa entre los genes de diferenciación y ese parche de coloración específico. Adicionalmente, *S. ruficollis* no formó parte de los análisis de diferenciación genómica entre las especies llevados a cabo por Campagna et al. (2017), ya que se contó únicamente con los genomas completos de tres individuos de dicho taxón y entonces no se lo pudo utilizar para identificar los picos de diferenciación entre las especies. Esto implica que los resultados de esta tesis, además de ser novedosos por su enfoque, también lo son porque permiten por primera vez comparar estas tres especies tan similares de manera conjunta.

Por otro lado, la distribución de *S. palustris* es bastante acotada y se encuentra en toda su extensión en simpatría con *S. hypoxantha* y *S. ruficollis*, pero estas dos últimas poseen distribuciones mucho más amplias que también incluyen áreas donde están únicamente ellas dos y otras en las que cada una de ellas está en alopatría y no comparte el ambiente con ningún otro capuchino (ver **Figura 1.4** y también *ebird.org* para más detalle de las distribuciones basadas en el reporte local de cada una de estas especies). Esto ofrece por lo tanto diferentes condiciones de simpatría y alopatría local de las poblaciones de estas especies y por lo tanto permite estudiar si en las áreas de simpatría se detectan diferencias con respecto a las poblaciones alopátricas de cada especie. Por ejemplo, se puede estudiar si la selección disruptiva impulsa el desplazamiento de diferentes caracteres cuando las especies están en simpatría. Específicamente, esto nunca ha sido estudiado en el canto de estas especies. Como se comentó más arriba, el canto es un carácter usado para el reconocimiento homoespecífico en el grupo (Benites et al. 2015) y por lo tanto el desplazamiento de sus características temporales y/o de frecuencia podría permitir evitar el solapamiento de los espacios acústicos, minimizando por ende la interferencia de esta señal entre las especies y facilitando su función (que como se comentó más arriba puede ser muy relevante en el contexto del aislamiento reproductivo y disminución de la hibridación). Alternativamente, la coexistencia en simpatría

durante la temporada reproductiva podría favorecer la convergencia de las variables del canto entre estas especies si ocurriese un aprendizaje interespecífico (flujo de caracteres comportamentales entre las especies) o si las vocalizaciones de las diferentes especies se adaptasen a las condiciones ambientales específicas de cada lugar (Cardoso & Price 2010), lo que arrojaría un resultado opuesto al del desplazamiento de caracteres divergente y debe también ser evaluado como una opción.

Finalmente, *S. iberaensis* es una especie recientemente descubierta y descripta (Di Giacomo & Kopuchian 2016), simpátrica con las otras tres (Di Giacomo & Kopuchian 2016; ver *ebird.org*) y que tampoco fue incorporada a los análisis genómicos de Campagna et al. (2017). Esto hace que sea una especie no solamente muy interesante para analizar por su reciente descubrimiento y escaso conocimiento en términos de su historia evolutiva, sino que además constituye un muy apropiado modelo simpátrico con las otras tres especies, pero sin un patrón de coloración tan similar y por ende sin que *a priori* se espere una similitud genómica tan marcada.

1.5. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general de la tesis consiste en estudiar el proceso de especiación en los capuchinos del sur, con particular énfasis en el rol de la selección y los mecanismos de aislamiento reproductivo pre-cigótico, considerando a este grupo como modelo para el análisis de la especiación en las aves neotropicales. Para ello, se estudiaron cuatro especies de capuchinos (*S. hypoxantha*, *S. ruficollis*, *S. palustris* y *S. iberaensis*) que nunca habían sido contrastadas juntas y que por la similitud de sus patrones de coloración y su distribución geográfica son particularmente apropiadas como modelo. Del objetivo general planteado se desprenden tres objetivos particulares:

1) Estudiar la **diferenciación genómica** entre *S. ruficollis, S. palustris, S. hypoxantha* y *S. iberaensis* realizando análisis de sus genomas completos y contrastando estos resultados mediante la comparación con el resto de las especies del grupo. Esto permitió encontrar las áreas genómicas de divergencia y los genes contenidos en ellas y poner a prueba la hipótesis de que las especies más similares en su coloración tendrán menor diferenciación genómica.
2) Comprender la **base genética de los patrones de coloración** de los capuchinos del sur. Esto fue posible mediante la realización de estudios de asociación entre el genotipo y el fenotipo conocidos como Estudios de Asociación del Genoma Completo (GWAS por sus siglas en inglés: Genome Wide Association Studies). Esto permitió identificar qué genes específicos,

qué combinaciones de genes y qué cambios o variantes de los mismos están asociados con las diferencias en los patrones de coloración del plumaje de los capuchinos.

3) Estudiar las **vocalizaciones** de *S. ruficollis, S. palustris, S. hypoxantha* y *S. iberaensis* y su distribución en el espacio acústico en diferentes escenarios de simpatría y alopatría durante su temporada reproductiva. Esto permitió estudiar la distribución del espacio acústico entre las especies y evaluar si las presiones de selección propician el desplazamiento o la convergencia de las características del canto cuando las especies están en simpatría.

CAPÍTULO II. ANÁLISIS GENÓMICOS DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. LOS PROCESOS DE DIVERGENCIA Y SU ARQUITECTURA GENÓMICA

Las técnicas de secuenciación de nueva generación ofrecen una oportunidad sin precedentes para estudiar la arquitectura genómica asociada a los procesos especiogénicos, resultando especialmente útiles para detectar y explorar las barreras reproductivas que previenen la homogeneización del genoma cuando hay flujo génico (Foote 2018, Richards et al. 2019). Varios de los estudios evolutivos basados en estas nuevas tecnologías apuntan a contrastar taxones hermanos en diferentes estadíos de sus procesos de divergencia (Feder et al. 2012, Wolf & Ellegren 2017). Estas investigaciones han encontrado en líneas generales que la arquitectura genómica depende primordialmente del tiempo de divergencia que separa a los taxones (**Figura 2.1**), observándose típicamente un incremento progresivo en la acumulación de cambios moleculares neutros a lo largo del genoma. Por ende, linajes que se separaron hace mucho tiempo presentan genomas más heterogéneos que linajes que se separaron recientemente (Feder et al. 2012, Roux et al. 2016, Ravinet et al. 2017, Wolf & Ellegren 2017, Marques et al. 2019).

Cuando la diversificación es reciente y transcurre en presencia de flujo génico es posible distinguir regiones específicas de divergencia alta (medidas generalmente en valores de *Fst*) en un contexto genómico comparativamente homogéneo en donde la divergencia genética neutra es prácticamente nula (**Figuras 2.1** y **2.2**; Marques et al. 2016, Foote 2018, Richards et al. 2019). Dichas regiones de divergencia suelen incluir genes asociados directamente con el aislamiento reproductivo (por inviabilidad, esterilidad o fitness reducido de los híbridos) o estar influenciados por presiones de selección, vinculadas generalmente con alguna adaptación local (Wu 2001, Turner et al. 2005, Wolf & Ellegren 2017). En torno a estos genes se forman las *"islas de divergencia*", caracterizadas por emerger entre regiones genómicas homogéneas que no han sido afectadas por presiones de selección (**Figura 2.3**; Turner et al. 2005). Este tipo de perfiles genómicos se asocia tradicionalmente con modelos de especiación simpátrica reciente, no obstante, afirmar que las *islas de divergencia* son siempre resultado de eventos de especiación puramente simpátrica es controversial y muy difícil de probar ya que otros procesos evolutivos (como la especiación alopátrica con contacto secundario) pueden haber trazado escenarios genómicos similares (Noor &

Bennett 2009, Turner & Hahn 2010, Cruickshank & Hahn, 2014, Ravinet et al. 2017; Foote 2018, Luzuriaga-Aveiga et al. 2021).

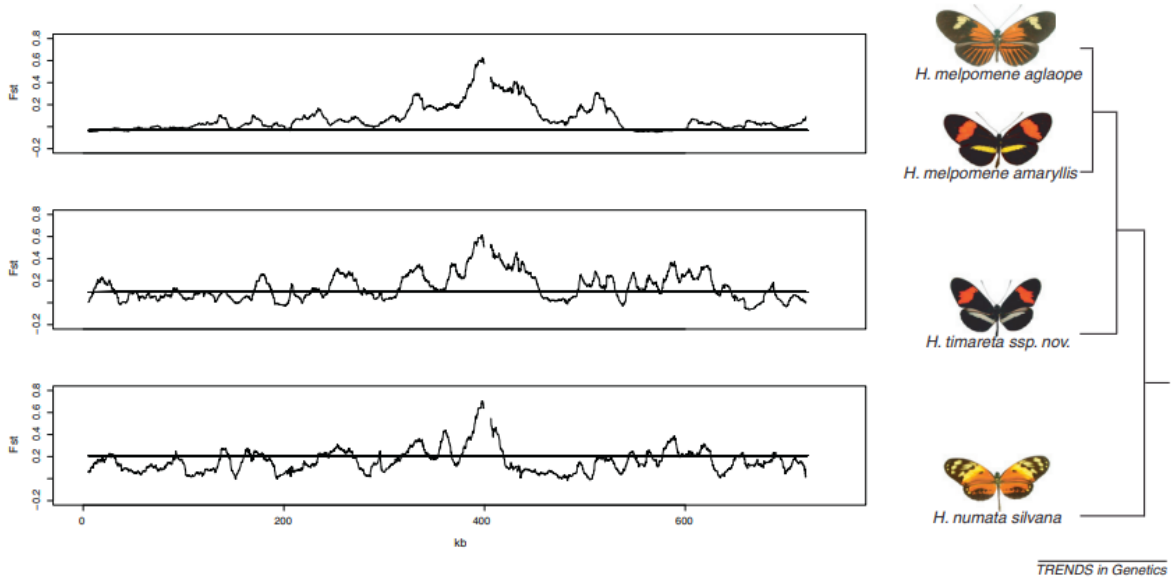


Figura 2.1: Diferenciación genómica (*Fst*) entre comparaciones de a pares de mariposas del género *Heliconius* en momentos diversos de su especiación. Se muestra un fragmento del genoma que contiene una región asociada a la coloración que se selecciona diferencialmente entre los taxones del género. La línea negra indica el umbral de divergencia neutra. Los niveles de divergencia incluyen la comparación de dos subespecies de *H. melpomene*, dos especies hermanas (*H. melpomene* vs *H. timereta*) y especies un poco más distantes filogenéticamente (*H. numata* vs el clado *H. melpomene* - *H. timereta*). A medida que la divergencia evolutiva avanza, las diferencias genómicas seleccionadas que existen desde el inicio del proceso han permanecido diferenciadas, mientras que la divergencia de otras regiones supuestamente neutrales ha aumentado constantemente, tal como se puede ver en el incremento de la línea que marca dicha divergencia. Gráfico modificado de Nadeau et al. 2012.

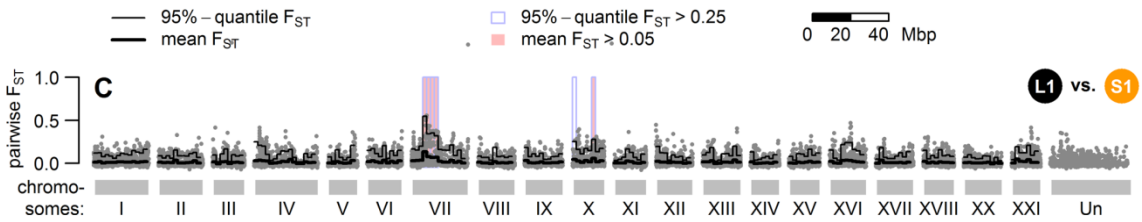


Figura 2.2: Regiones de divergencia genómica entre dos poblaciones de peces espinosos (*Gasterosteus aculeatus*) simpátricos que poseen ecotipos diferentes. Las regiones de diferenciación genómica elevada en los cromosomas VII y X (indicados en recuadros rosados y celestes) se asociaron con diferencias en los ecotipos. El resto del genoma mostró poca divergencia. Imagen modificada de Marques et al. 2016.

2.1.2. RADIACIONES ADAPTATIVAS

Las radiaciones adaptativas son patrones excepcionales de diversificación biológica promovidos por diferentes factores evolutivos (deriva génica, selección, hibridación, etc) que interactúan de manera compleja (Gavrilets & Losos 2006), en donde los linajes se multiplican rápidamente *in situ* tras el surgimiento de nuevas oportunidades ecológicas, suscitadas generalmente por eventos de colonización de nuevos ambientes o por la aparición de novedades morfológicas (**Figura 2.4**; Gavrilets & Vose 2005, Gavrilets & Losos 2006, Losos & Mahler 2010). Han contribuido sustancialmente a la comprensión de los procesos de especiación y son consideradas promotoras fundamentales de la diversidad ecológica y fenotípica observada entre los seres vivos (Gavrilets & Losos 2006). Existen ejemplos de ellas en una enorme variedad de grupos taxonómicos, tales como las aves de la familia Vangidae en Madagascar (Yamagishi et al. 2001) y los pinzones de Darwin (Grant & Grant 1979), los peces cíclidos del lago Victoria (Seehausen 2006), las plantas hawaianas del género *Lobelia* (Givnish et al. 2009) y las lagartijas caribeñas del género *Anolis* (Losos & Schneider 2009). Mientras que en muchos casos comprenden la acumulación de especies durante largos periodos de tiempo (como en mieleros hawaianos de la subfamilia Drepanidinae; Lovette et al. 2002), en otros casos han surgido en períodos relativamente cortos de tiempo (como sucede en varios linajes de aves semilleras; Arnaiz-Villena et al.1998, Petren et al.1999, Benkman 2003, Sorenson 2003).

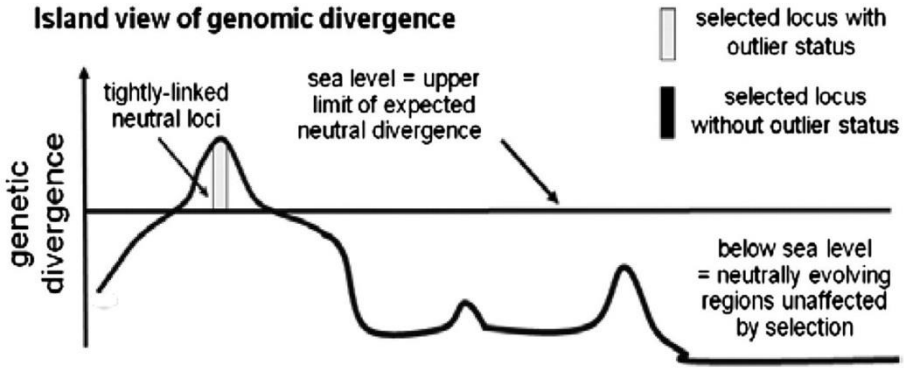


Figura 2.3: Arquitectura de las islas genómicas de divergencia. El eje Y representa el grado de divergencia genómica. La línea negra horizontal representa el umbral de divergencia genética neutra. Las barras grises caracterizan genes que se encuentran bajo el efecto de la selección (sobre el umbral de divergencia neutra). Los *loci* neutrales que rodean a los *loci* bajo selección aumentan el tamaño de la isla de divergencia. Las regiones genómicas no sujetas a las presiones de selección se encuentran por debajo del umbral de divergencia neutra. Esquema tomado de Michel et al.2010.

En el capítulo introductorio anterior se explica por qué los capuchinos del sur del género *Sporophila* constituyen una radiación continental particularmente adecuada para estudiar los procesos evolutivos de las aves del neotrópico. En este capítulo se estudia justamente la arquitectura genómica de este grupo, con foco en las cuatro especies utilizadas como modelo de estudio (*S. hypoxantha*, *S. ruficollis*, *S. palustris*, *S iberaensis*) y se analiza cómo la misma puede brindar información relevante sobre su historia evolutiva. Para ello, antes se realiza un repaso detallado de lo que se conoce hasta ahora de la historia evolutiva del grupo.

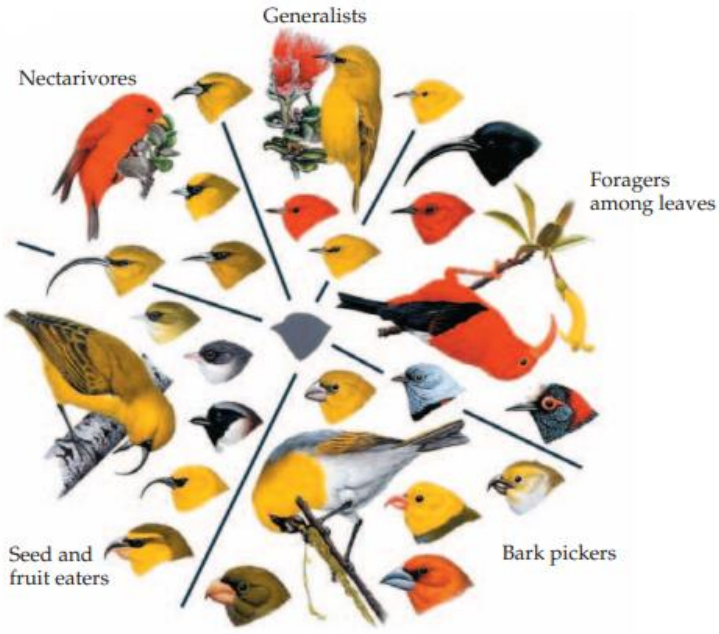


Figura 2.4: Radiación adaptativa de los mieleros hawaianos (subfamilia Drepanidinae). Las especies del grupo exhiben innovaciones asombrosas en la morfología de su pico surgidas bajo condiciones ecológicas específicas que les permiten explotar diversos recursos alimenticios. Gráfico tomado de Lovette et al. 2002.

2.1.3. LA HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR

PRIMERAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DE LA DIVERSIFICACIÓN DEL GRUPO

El género *Sporophila* es uno de los más diversos de la familia Thraupidae, se compone de 41 especies granívoras de tamaño pequeño (10-12 cm), con picos cónicos y robustos, que presentan un fuerte dimorfismo sexual (Ridgely & Tudor 1989). Habitan ambientes abiertos y semiabiertos, y se distribuyen desde Sudamérica hasta el sur de Norteamérica (De Schauensee 1952). Desde su descripción, establecer los límites y las relaciones filogenéticas dentro del grupo ha resultado una tarea compleja. De hecho, las primeras filogenias del género basadas en caracteres morfológicos

(como la coloración, el canto y la morfometría del pico) resultaron inconclusas y confusas (De Schauensee 1952, Ouellet 1992, Ridgely & Tudor 1989). Adicionalmente, la falta de criterios generales al momento de definir como especies algunas de las formas incluidas dentro del género, ha hecho que algunas entidades designadas hoy formalmente como especies hayan sido en el pasado consideradas subespecies o inclusive morfos, y viceversa (De Schauensee 1952; Ridgely &Tudor 1989; Sibley & Monroe 1990, Areta 2008).

Ya en el presente siglo, el estudio de la historia evolutiva del grupo comenzó a abordarse a través de la realización de filogenias moleculares, las primeras de las cuales fueron construidas en base a secuencias cortas (de unos pocos cientos de pares de bases) de ADN mitocondrial (mtDNA; Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2010). Estos primeros estudios permitieron comenzar a esclarecer las relaciones evolutivas del género, estableciendo además como grupo monofilético a los capuchinos (un subgrupo compuesto en ese momento por 11 especies de coloración castaña acanelada) y diferenciando dentro del mismo dos subclados: uno que contenía las especies del norte de Sudamérica (*S. minuta* y *S castaneiventris*) y otro que agrupaba las especies al sur del río Amazonas (*S. bouvreuil*, *S. cinnamomea, S. hypochroma*, *S. hypoxantha*, *S. melanogaster*, *S. nigrorufa*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. zelichi*; **Figura 2.5**). Estos primeros análisis, sin embargo, no lograron resolver las relaciones filogenéticas de los capuchinos del sur por la baja variabilidad genética que mostró el grupo para los marcadores mitocondriales utilizados y la falta de monofilia recíproca entre las especies. Consistentemente, el uso del gen mitocondrial de la *citocromo c oxidasa I* (COI) en uno de estos estudios (Campagna et al. 2010) mostró que los capuchinos del sur poseen una mayor divergencia intraespecífica y una menor divergencia interespecífica mitocondrial que la esperada de acuerdo a los patrones de las aves de la región. De esta forma, los primeros estudios basados en marcadores mitocondriales sugirieron que el patrón genético observado en el grupo era consistente con procesos de separación incompleta de linajes (*incomplete lineage sorting)* y flujo génico elevado (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2010).

La incorporación de secuencias mitocondriales más largas (mayor cantidad de genes) y marcadores y microsatélites nucleares no cambió el panorama, mostrando que efectivamente la diferenciación genética neutra dentro del grupo es sumamente escasa y sin monofilia recíproca, consistente con una radiación evolutiva reciente originada en el Pleistoceno (hace aproximadamente 0,5–1,2 millones de años) en la que como se menciona arriba aún no ha habido una separación completa de

linajes y que ha sufrido un nivel significativo de flujo génico (Campagna et al. 2012, 2013). La combinación de estos marcadores genéticos con mediciones y análisis objetivos de la coloración y las vocalizaciones del grupo sí permitió confirmar las diferencias entre las especies en estos dos aspectos fenotípicos y mostró que las mismas exceden notoriamente a las diferencias genéticas neutras (**Figura 2.6;** Campagna et al. 2012).

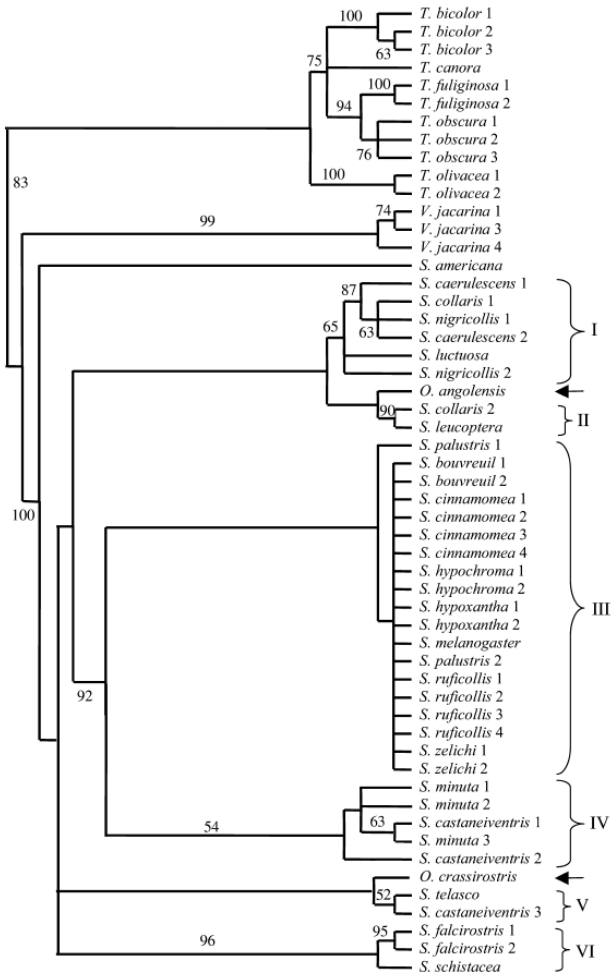


Figura 2.5: **Primera filogenia molecular del género *Sporophila***. Consenso de 96 árboles igualmente parsimoniosos basados en un fragmento de 306 pares de bases de *CytB*. Los números romanos señalan los seis clados dentro del género *Sporophila*. El clado III representa a los capuchinos del sur. Gráfico tomado de Lijtmaer et al. 2004.

La implementación más reciente de técnicas genómicas para el estudio de la historia evolutiva del grupo (Campagna et al. 2015) llevó a obtener miles de marcadores nucleares neutros mediante ddRADseq, una técnica que se basa en la fragmentación del genoma por clivaje y posterior

secuenciación masiva del mismo. Aun trabajando a esta nueva escala en términos de cantidad de información, los resultados llevaron a las mismas conclusiones que en los estudios previos, confirmando la falta de monofilia recíproca entre las especies como resultado de la separación incompleta de linajes y el flujo génico, y sugiriendo que los capuchinos del sur emergieron hace aproximadamente 50.000 generaciones de una población ancestral de gran tamaño y altamente polimórfica.

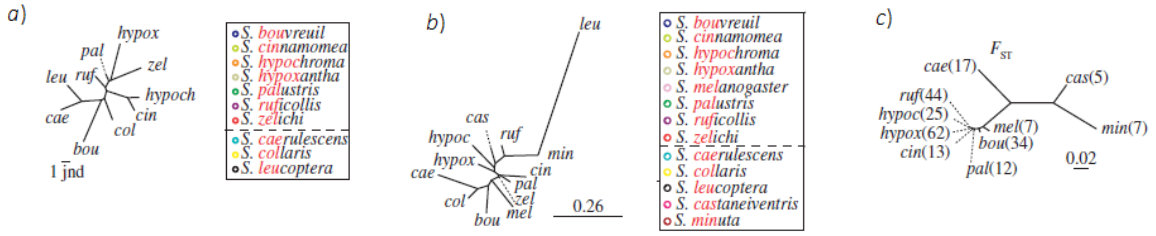


Figura 2.6: Árboles de *Neighbour-joining* (NJ) que representan la diferenciación en diferentes caracteres en los capuchinos del sur del género *Sporophila*. (A) Árbol de NJ para ocho especies de capuchinos del sur y otras tres especies del género basado en valores promedio de ΔS (métrica de diferencia de color en el espacio visual aviano) entre pares de especies. **(B)** Árbol de NJ para ocho especies de capuchinos del sur y otras cinco especies del género basado en una matriz de similitud vocal calculada en base al uso de sílabas entre pares de especies. La escala representa el umbral de variación intraespecífica. **(C)** Árbol de NJ construido en base a valores de *Fst* estimados al contrastar seis microsatélites de ADN nuclear entre pares de especies del género *Sporophila* (siete capuchinos y otras tres especies del género). Las líneas intermitentes indican comparaciones significativas entre las especies. Figuras extraídas y modificadas de Campagna et al. 2012.

LOS GENOMAS COMPLETOS PERMITEN COMENZAR A COMPRENDER LOS PROCESOS Y MECANISMOS EVOLUTIVOS EN EL GRUPO

Más recientemente, y solo un par de años antes del comienzo de mi doctorado, la secuenciación de genomas completos de los capuchinos del sur nos permitió comenzar a entender algunos de los procesos de diversificación que habrían promovido la radiación del grupo y sus mecanismos. Específicamente, se obtuvo *de novo* un genoma de *S. hypoxantha* de alta cobertura que se usó como referencia y 72 genomas pertenecientes a 12 individuos de cinco especies del grupo y unos pocos individuos de otras cuatro especies (Campagna et al. 2017). Este estudio confirmó que las especies del grupo son extremadamente similares genéticamente, estimando que su divergencia genómica oscila entre 0,03% (obtenido al contrastar *S. hypoxantha* y *S. palustris*, dos especies altamente simpátricas) y 0,3% (obtenido al contrastar *S. melanogaster* y *S. nigrorufa*, dos especies totalmente alopátricas). Sin embargo, lo más destacado de esta nueva aproximación es que por primera vez se

pudieron identificar las áreas de divergencia entre las especies, habiéndose detectado específicamente 25 islas de divergencia genómica elevada (*Fst* > 0.2). Dichas regiones de diferenciación se encontraron repetidamente en los contrastes entre pares de especies y con frecuencia contenían genes involucrados en la producción de melanina (pigmento que da color al plumaje de los capuchinos; **Figura 2.7**). No obstante, se observó que las señales más potentes de divergencia no provenían de regiones codificantes, sino (mayoritariamente) de regiones regulatorias que flanquean a los genes. En base a estos resultados, Campagna et al. (2017) concluyeron que las presiones de selección han actuado independientemente en distintos linajes sobre estas pocas regiones facilitando la rápida radiación de los capuchinos del sur (incluso en presencia de flujo génico).

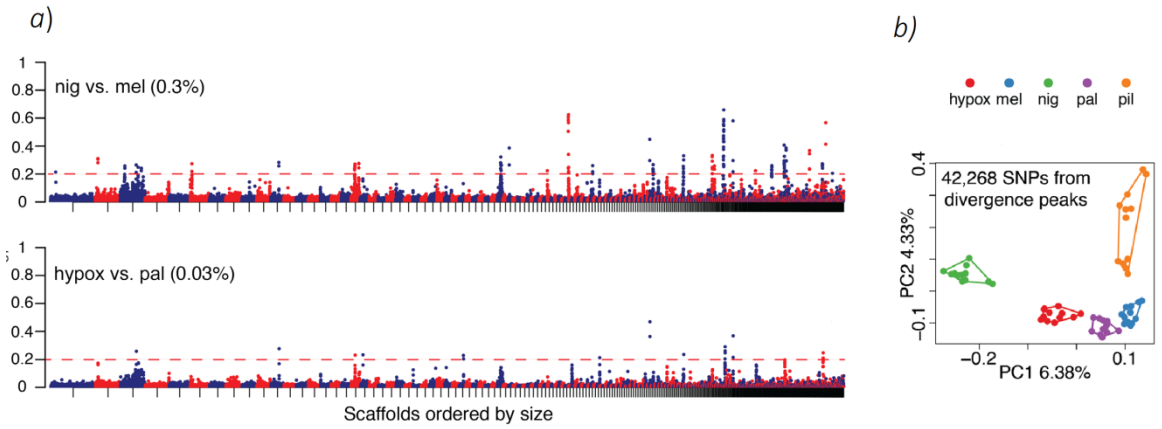


Figura 2.7: Estructura genómica de los capuchinos del sur. (A) Gráficos Manhattan contrastando *S. nigrorufa* vs *S. melanogaster* (arriba) y *S. hypoxantha* vs *S. palustris* (abajo). El eje Y indica el valor *Fst* promedio de ventanas no solapadas de 25 kb, el eje X muestra los *scaffolds* (fragmentos obtenidos durante el proceso de secuenciación) ordenados por tamaño. Las líneas rojas intermitentes representan el umbral de divergencia significativa (*Fs t*= 0.2). **(B)** PCA construido en base a los SNPs contenidos en las regiones de divergencia que existen entre cinco especies de capuchinos del sur, que claramente permiten separarlas. Imágenes modificadas a partir de Campagna et al. 2017.

Más recientemente, estas islas de divergencia fueron re-analizadas mediante simulaciones teóricas y métodos de aprendizaje automático (*machine-learning methods*), lo que indicó que en el establecimiento de dichas islas de diferenciación han tenido un rol importante barridos selectivos especie-específicos que han ocurrido recientemente en regiones que ancestralmente contaban con una variabilidad genómica alta, asociada en muchos casos con genes de la coloración (Hejase et al. 2020).

En definitiva, el contar con análisis de genomas completos del grupo permitió confirmar que la diferenciación entre sus especies es extremadamente baja y se restringe a las regiones de control de unos pocos genes, principalmente relacionados con la síntesis de melanina. Sin embargo, muchos interrogantes aún persisten. En primer lugar, estas zonas genómicas de diferenciación se definieron en base a los genomas de solo 5 especies del grupo (aquellas con las cuales se contaba con al menos 12 genomas que permitían un análisis sólido de *Fst: S. hypoxantha, S. melanogaster, S. nigrorufa, S. pileata y S. palustris*), pero no está claro si hay otras zonas de divergencia aún no detectadas, ni cuál sería el patrón al incluir más especies. Específicamente, se desconoce aún si existe una correlación entre el grado de diferenciación de color entre las especies y sus diferencias genómicas. Desde un punto de vista más mecanístico, resta comprender de manera detallada cómo las diferencias genómicas afectan a los diferentes parches de plumaje de los capuchinos, generando las diferencias en sus patrones de coloración. Estos interrogantes son los que se han atacado en esta tesis, y específicamente en este capítulo y el siguiente.

2.1.4. AMPLIACIÓN Y PROFUNDIZACIÓN DEL ESTUDIO DE LA DIVERGENCIA GENÓMICA DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR

El presente capítulo consiste en una ampliación y profundización de los análisis previos sobre la diversificación de los capuchinos que han utilizado genomas completos. Para ello, se consideraron tres aspectos que fueron estudiados de manera integrada: 1) En primer lugar se generaron nuevos genomas completos y se incrementó así la cantidad de especies utilizadas para analizar la divergencia dentro del grupo, los picos de diferenciación en el genoma y los genes contenidos en los mismos; 2) Se plantearon por primera vez de manera explícita hipótesis específicas sobre la evolución de las diferencias en el grupo, más específicamente en la correlación entre la diferenciación genómica y la coloración, que pudieron ser puestas a prueba aprovechando justamente la disponibilidad de genomas de más especies (y de más individuos de varias de ellas); 3) se realizó un análisis más fino sobre la divergencia entre las especies que presentan una menor diferenciación en su coloración y constituyen el grupo focal de esta tesis: *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis*, incorporando además a *S. iberaensis* a este análisis. A continuación, se explican en más detalle estos aspectos y su enfoque.

En relación con el primero de los aspectos mencionados, se secuenciaron en el contexto de esta tesis los genomas completos de nuevos individuos de *S. ruficollis* y se incorporaron además a los

análisis las primeras secuencias genómicas de *S. iberaensis* y nuevas secuencias de *S. hypoxantha* (las secuencias de estas dos especies fueron generadas recientemente en el contexto de un estudio más amplio del que he formado parte; Turbek et al. 2021). La inclusión de *S. ruficollis* y *S. iberaensis* posibilita pasar de 5 a 7 especies con una cantidad de genomas que permita realizar comparaciones robustas (al menos 12 individuos) e incluir por lo tanto la mayoría de los taxones del grupo en los análisis (son 10 especies en total). Este incremento en la cantidad de especies permitió además indagar por primera vez si existe una relación entre la diferenciación morfológica en torno a la coloración de los parches del plumaje y la divergencia genómica en los capuchinos del sur, lo que constituye el segundo aspecto descripto arriba. Para ello se correlacionaron distintos estimadores de divergencia genómica con la cantidad de parches divergentes que existen entre las especies.

Por último, quisiera destacar que la inclusión de *S. ruficollis* y *S. iberaensis* va más allá de permitir contar con genomas de más especies, ya que ambas enriquecen además los análisis por poseer características relevantes para comprender las circunstancias que propiciaron la radiación evolutiva del grupo y describir los patrones y las huellas que han trazado dichos procesos a nivel molecular. En relación con la primera de ellas, *S. ruficollis*, *S. hypoxantha* y *S. palustris* son ecológica y morfológicamente muy similares, y además tienen un solapamiento marcado en su distribución durante la temporada reproductiva, fundamentalmente en el noreste argentino. Si bien *S. palustris* difiere sutilmente en el microhábitat usado para nidificar en relación a otros capuchinos (Vizentín-Bugoni et al. 2013), se sabe que generalmente estas tres especies habitan ambientes similares, y que inclusive, pueden reproducirse en territorios contiguos, es decir, sin barreras extrínsecas aparentes (Turbek et al. 2021, Billerman et al. 2022 y observaciones personales). Como sucede con el resto de los capuchinos del sur, morfológicamente son muy parecidas. No difieren ni en su peso, ni en la morfometría de su pico, ni en otras medidas corporales (Di Giacomo & Kopuchian 2016, Billerman et al. 2022); pero si en su coloración y en sus vocalizaciones, dos caracteres fenotípicos particularmente importantes para el aislamiento reproductivo en aves (Price 2008), que además son clave para el reconocimiento específico dentro del grupo (Benites et al. 2015, Turbek et al. 2021). Notoriamente, y a pesar de que los capuchinos en general difieren en la coloración de varios parches del plumaje a la vez, *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* solo varían en la coloración del parche de la garganta (canela, blanca y negra respectivamente; **Figura 2.8**). Esto las convierte en las especies con mayor similitud morfológica del grupo. Congruentemente, los contrastes genómicos entre *S. hypoxantha* y *S. palustris* mostraron en el pasado que estas especies son las de menor

divergencia genómica de las cinco que se habían estudiado hasta ahora en base a sus genomas completos (ver **Figura 2.7A**; Campagna et al. 2017). En este sentido, el haber generado los genomas completos de *S. ruficollis* permite realizar por primera vez una comparación específica entre estas tres especies que solamente difieren en un parche de coloración y comprender cuál es el grado de diferenciación genómica que presentan.

Figura 2.8: Ilustraciones de *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis*. En los dibujos puede apreciarse que estas tres especies difieren únicamente en el color de su garganta, siendo la misma color canela en *S. hypoxantha* (continuando con la coloración de su parte ventral), blanca en *S. palustris* y negra en *S. ruficollis*. Ilustraciones de Jillian Ditner.

La inclusión de *S. iberaensis* en los análisis también constituye un aporte novedoso. Por un lado, su reciente descubrimiento y descripción (Di Giacomo & Kopuchian 2016) hizo que no se contase con información genética ni genómica de esta especie hasta hace muy poco, pero además esta especie también es simpátrica con las otras tres. Constituye así un modelo simpátrico pero sin un patrón de coloración tan similar, por lo que sirve como control en las comparaciones focales a realizar.

Teniendo en cuenta estos aspectos se plantearon los objetivos e hipótesis de trabajo de este capítulo, que se presentan en la siguiente sección.

2.1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO

El objetivo general de este capítulo es ampliar y profundizar el conocimiento que se tiene sobre la base genómica de la radiación evolutiva de los capuchinos del sur del género *Sporophila* incorporando dos especies (*S. ruficollis* y *S. iberaensis*) que no habían sido exploradas con anterioridad y analizando explícitamente la relación entre la variabilidad genética y morfológica dentro del grupo. Del objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos:

1) Estimar la divergencia genómica de los capuchinos del sur utilizando siete de las diez especies del grupo (*S. hypoxantha*, *S. melanogaster*, *S. nigrorufa*, *S. paustris*, *S. pileata, S.*

ruficollis y *S. iberaensis*) y analizar si es posible distinguir a las mismas en base a dicha divergencia.

2) Identificar, explorar y describir los picos de divergencia genómica hallados en los contrastes de pares de especies, procurando definir y describir la funcionalidad de los genes que se encuentran contenidos en ellos y cuál puede haber sido su rol en la radiación del grupo.
3) Determinar si en los capuchinos del sur existe una asociación significativa entre su divergencia en la coloración del plumaje y su divergencia genómica, prestando especial atención a las especies del grupo que muestran menor divergencia morfológica (*S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis*).

En el contexto de los objetivos del capítulo y los antecedentes arriba mencionados, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

H1) Los contrastes de genomas completos de un mayor número de especies de capuchinos del sur confirmarán la relevancia de las regiones del genoma reportadas previamente y permitirán identificar nuevas regiones de divergencia.

H2) Las regiones de divergencia genómica entre los capuchinos incluyen primordialmente genes involucrados en el camino metabólico de la producción de la melanina (pigmento que colorea sus plumas).

H3) Los SNPs con valores elevados de *Fst* contenidos en los picos de divergencia genómica se posicionarán generalmente en regiones reguladoras no codificantes y no en las secuencias génicas en sí mismas.

H4) Las especies con mayor diferenciación en su coloración tendrán también mayor divergencia genética. Particularmente, *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* (especies que difieren en su coloración únicamente en el parche de la garganta) tendrán una muy baja diferenciación genómica y serán genéticamente más similares entre sí que cuando se comparan con el resto de las especies de capuchinos (con las que difieren en la coloración de varios parches del plumaje).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MUESTREO Y CONJUNTO DE DATOS

El conjunto de datos completo utilizado en esta tesis consistió en 127 genomas completos pertenecientes a individuos de las diez especies de capuchinos del sur (4 *S. bouvreuil*, 3 *S. cinnamomea*, 4 *S. hypochroma*, 28 *S. hypoxantha*, 21 *S. iberaensis*, 12 *S. melanogaster*, 12 *S.*

nigrorufa, 12 *S. palustris*, 12 *S. pileata* y 15 *S. ruficollis*) y dos capuchinos que están presentes al norte del Río Amazonas (2 *S. minuta* y 2 *S. castaneiventris*) y están estrechamente relacionados con los capuchinos del sur (Campagna et al. 2013). Del total de estos genomas, 78 ya habían sido generados a lo largo de las etapas más recientes del estudio de este grupo de aves (Campagna et al. 2017) y 37 individuos fueron secuenciados recientemente como parte del estudio de *S. iberaensis* llevado a cabo en paralelo a esta tesis y del cual nuestro grupo de trabajo formó parte (Turbek et al. 2021). Sumados a dichos genomas que pudieron utilizarse, para esta tesis se secuenciaron especialmente los genomas completos de 12 individuos de *S. ruficollis*, algo que (como se ha mencionado en la sección anterior) era fundamental para poder considerar a esta especies como parte del grupo focal de la tesis y compararla con *S. palustris* y *S. hypoxantha*.

Las sub-muestras se tomaron a partir de muestras de tejido muscular o sanguíneo de 12 machos adultos de *S. ruficollis* que estaban depositados en colecciones de museos (**Tabla 2.1**). En el caso de las muestras depositadas en museos del exterior, se realizaron solicitudes de préstamo del material. El ADN se extrajo utilizando un protocolo de fenol-cloroformo seguido de una precipitación con etanol y una limpieza con perlas magnéticas. Se siguió el protocolo del kit de preparación de bibliotecas de ADN TruSeq Nano (Illumina) para un tamaño de inserción de 550 pb, empleándose 200 ng de cada muestra para preparar bibliotecas con códigos de barras individuales. Las 12 bibliotecas se juntaron y se identificaron usando adaptadores ligados de ADN. La secuenciación del conjunto de bibliotecas se realizó en un carril (*lane*) en un secuenciador Illumina NextSeq 500 del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Cornell (Nueva York, EEUU). En total se obtuvieron aproximadamente 353 millones de pares de lecturas de 151 pb de longitud, con una cobertura promedio esperada por individuo de 7,4 ± 1,8x. La calidad de las librerías obtenidas se estimó usando el programa fastqc versión 0.11.5 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) y los pasos de recorte de secuencias, eliminación de adaptadores y filtrado de calidad se llevaron a cabo con el programa AdapterRemoval versión 2.1.1 (Lindgreen 2012). El valor de calidad *Phred* mínimo admitido fue de 10 y las lecturas que se emparejaron y superpusieron se fusionaron. Una vez realizados los pasos de control de calidad y remoción de adaptadores la cobertura promedio esperada fue de 6,8 ± 1,6x.

2.2.2. DESCUBRIMIENTO DE VARIABLES

Las 127 secuencias de capuchinos del sur se alinearon al genoma de referencia de alta resolución de un macho de *S. hypoxantha* que había sido ensamblado como parte de los estudios previos (Campagna et al. 2017). Esto se ejecutó con la opción local "*very sensible*" del programa Bowtie 2 versión 2.2.8 (Langmead & Salzberg, 2012). Aunque el genoma de referencia está ensamblado a nivel de *scaffolds*, la correspondencia entre los *scaffolds* y los cromosomas se estableció por similitud, comparando con el genoma de referencia de un pinzón cebra (*Taeniopygia guttata castanotis*) que estaba ensamblado a nivel cromosómico (Campagna et al. 2017). La calidad del mapeo se evaluó usando el programa Qualimap versión 2.1.1 (Okonechnikov et al. 2016), y posteriormente se obtuvieron diferentes estadísticos de los archivos *.bam* generados. El porcentaje medio de secuencias alineadas obtenido fue mayor al 98,3% (± 0,5%), tuvo una tasa de duplicación media de 4,2 (± 1) y una cobertura media tras los procesos de filtrado y alineamiento de 5,9x (± 2,3x).

Una de las 12 muestras de *S. ruficollis*, mostró signos de contaminación bacteriana después de que se sub-muestrearan las lecturas y se alinearan con una base de datos de nucleótidos utilizando el script *fastq_species_detector* (biohpc.cornell.edu/lab/userguide). Esta muestra tuvo una tasa de alineación con el genoma de referencia más baja que el resto de las muestras (35,4%) y por ello se excluyó de las estadísticas mencionadas anteriormente. Luego del paso de alineación, la profundidad de cobertura para esta muestra fue de 1,68x.

El descubrimiento de las variantes SNP y el genotipado se realizaron simultáneamente para las 127 muestras utilizando el programa HaplotypeCaller en GATK versión 3.8 (McKenna et al. 2010). Los parámetros de filtrado utilizados para excluir variantes en GATK fueron: QD < 2,0, FS > 60,0, MQ < 20,0 y *ReadPosRankSum* < -8,0. Por otro lado, usando el programa VCFtools versión 0.1.13 (Danecek et al., 2011) se filtraron las variantes del conjunto de datos si no eran bialélicos, tenían un recuento, tenían un recuento de alelos menores inferior a 4, tenían una profundidad de cobertura media inferior a 2 o superior a 50 y/o si poseían más de un 20 % de datos faltantes entre individuos. Como resultado, se obtuvieron 32.993.511 SNPs para los 127 individuos muestreados de las diez especies de capuchinos estudiadas.

Tabla 2.1: Detalle de las muestras de *S. ruficollis* secuenciadas en esta tesis, incluyendo los estadísticos de secuenciación.

Número de catálogo*	Año de colecta	Localidad	Lat	Lon	Sexo	Cobertura esperada [1]	Cobertura esperada [2]	Profundidad de cobertura [3]	% de duplicados	Tasa de alineamiento
FMNH 334579	1987	Chiriquitos, Santa Cruz, Bolivia	-17,82	-60,79	M	6,98	6,61	6,5	3,87	98,56
FMNH 334580	1987	Chiriquitos, Santa Cruz, Bolivia	-17,82	-,79	M	9,34	8,43	8,34	4,36	98,17
FMNH 334583	1987	Chiriquitos, Santa Cruz, Bolivia	-17,82	-60,79	M	8,55	8,04	7,97	4,2	98,85
LSUMZ 15264	1989	Prov. Velasco, Santa Cruz, Bolivia	-14,55	-60,92	M	9,67	8,8	8,72	5,47	98,8
LSUMZ 15395	1989	Prov. Velasco, Santa Cruz, Bolivia	-14,57	-60,67	M	9,91	9,23	9,14	5,46	98,76
LSUMZ 15406	1989	Prov. Velasco, Santa Cruz, Bolivia	-14,57	-60,67	M	5,99	5,67	5,61	3,79	98,67
MACN-Or-ct 2086	2006	Estación Biológica de Corrientes, Argentina	-27,55	-58,68	M	8,81	8,15	5,33	4,51	98,12
MACN-Or-ct 8696	1999	Artigas, Uruguay	-30,42	-57,72	M	7,5	5,58	1,68	5,62	35,37
MACN-Or-ct 8697	1999	Artigas, Uruguay	-30,42	-57,72	M	5,96	5,59	3,75	4,36	98,17
MACN-Or-ct 8699	1999	Artigas, Uruguay	-30,42	-57,72	M	4,94	4,76	3,09	2,74	98,01
MACN-Or-ct 8836	2003	Paysandú, Uruguay	-32,05	-57,71	M	6,41	5,78	4,17	5,38	97,35
MACN-Or-ct 9275	2017	Cautivo en Temaikèn, Argentina	-	-	M	4,9	4,73	2,78	2,48	98,03

*FMNH Field Museum of Natural History; LSUMZ Louisiana State University Museum of Natural Science; MACN-Or-ct Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"- Colección de Tejidos Ultracongelados.

1Calculado a partir del número total de lecturas sin procesar y un tamaño de genoma aproximado de 1,2 Gb.

[2]Calculado a partir del número de lecturas restantes después del filtrado y un tamaño de genoma aproximado de 1,2 Gb.

[3]Calculado a partir de las lecturas alineadas con el genoma de referencia.

2.2.3. EXPLORACIÓN DE LAS REGIONES DE DIVERGENCIA

Se utilizó el programa VCFtools versión 0.1.16 (Danecek et al. 2011) para submuestrear el conjunto de datos completo y seleccionar únicamente las secuencias pertenecientes a especies representadas por al menos 12 individuos. Se excluyeron además dos individuos de *S. hypoxantha* que al momento de realizar los análisis de este capítulo estuvieron clasificados erróneamente y la muestra de *S. ruficollis* que mostró contaminación. De esta forma el dataset completo utilizado en este capítulo consistió de: 26 *S. hypoxantha*, 21 *S. iberaensis*, 12 *S. melanogaster*, 12 *S. nigrorufa*, 12 *S. palustris*, 12 *S. pileata* y 14 *S. ruficollis* (siete especies, 109 individuos, 31.998.877 SNPs en total). Para llevar a cabo una primera exploración de los datos se realizó un análisis de componentes principales (PCA) basado todos los SNPs del dataset utilizando el programa SNPRelate versión 3.15 (Zheng et al. 2012) en R versión 4.0.3 (R Core Team, 2020). Luego, con VCFtools versión 0.1.16 (Danecek et al. 2011) se realizaron los 21 contrastes posibles de a pares de especies. Dichos contrastes de pares de especies se realizaron de dos maneras: a) estimando valores promedio de *Fst* para ventanas de 5kb no superpuestas y b) calculando valores de *Fst* individuales para cada sitio de divergencia genómica (sin ventanas). El tamaño de ventana elegido (5kb) para calcular valores *Fst* por ventana difiere del utilizado por Campagna et al. 2017 (25kb) ya que actualmente se sabe que las regiones de divergencia genómica entre los capuchinos son (generalmente) pequeñas (ver **Tabla 1** en Campagna et al. 2017). Para determinar los picos de divergencia genómica entre los pares de especies primero se seleccionaron las regiones de divergencia que comprendieron por lo menos dos ventanas de 5kb consecutivas con valores *Fst* promedio globales iguales o superiores a 0,2 (como el promedio de valores de *Fst* de todas las comparaciones fue 0,008, este criterio de significancia selecciona regiones que se encuentran entre 12 y 13 desvíos estándar por encima de la media de *Fst*; este fue además el umbral de significancia usado por Campagna et al. 2017 y normalmente utilizado en estudios de este tipo). Posteriormente, de las regiones seleccionadas solo se consideraron picos de divergencia genómica aquellas que tuvieron al menos 5 SNPs con valores de *Fst* individuales iguales o superiores a 0,85 (umbral de significancia obtenido luego de hacer una corrección de Bonferroni en base a los SNPs contenidos en el dataset completo). La ubicación de cada pico de divergencia se definió como la porción de ADN abarcada entre los SNPs iguales o mayores que 0,85 más cercanos a los extremos 5' y 3' dentro del grupo de SNPs del pico.

Los contrastes de pares de especies basados en ventanas de 5kb se representaron en gráficos de Manhattan ("*Manhattan plots*") usando el paquete "qqman" (Turner 2018) en R versión 3.6.1.

Utilizando SNPRelate versión 3.15 (Zheng et al. 2012) en R versión 4.0.3 se realizó un PCA para intentar distinguir a las siete especies capuchinos del sur únicamente en base al conjunto de los 140.764 SNPs contenidos dentro de los picos de divergencia que se encontraron en al menos dos contrastes de pares de especies. También se realizaron análisis de PCAs individuales para cada pico de divergencia que cumplió con dicho requisito (aunque por simplicidad solo se muestran aquellos que involucran contrastes que involucran a *S. ruficollis* y *S. iberaensis*, las dos especies incorporadas en estos análisis que no habían sido estudiadas de manera detallada previamente en este sentido). Finalmente, con el programa Geneious v. 10.2.6 (Kearse et al. 2012) se usó el genoma de referencia de alta resolución de *S. hypoxantha* mencionado más arriba para inspeccionar las regiones divergentes y compilar todos los genes contenidos dentro de rangos de ±50 kb de cada pico de divergencia. Las funciones de los genes contenidos en las regiones de divergencia se buscaron manualmente en el repositorio de datos de *Gene Cards* (https://www.genecards.org). La distribución de los SNPs individuales mayores o iguales que 0,85 obtenidos en los contrastes de pares de especies que involucraron a *S. ruficollis* y *S. iberaensis* y la posición de los genes contenidos en rangos de ±50 kb de sus regiones de divergencia se representaron gráficamente en R versión 4.0.3.

2.2.4. RELACIÓN ENTRE LA DIVERGENCIA GENOTÍPICA Y LA DIFERENCIACIÓN EN LA COLORACIÓN DEL PLUMAJE

Para estudiar la relación entre la divergencia genómica y la diferenciación fenotípica en la coloración de los parches de plumaje se realizaron estimaciones de diversidad genotípica que involucraron a *Fst* y *dxy*, dos estimadores de divergencia genética para linajes incipientes que aportan información complementaria. Mientras que *Fst* (el índice más utilizado) calcula el grado diferenciación genética en base a las varianzas estandarizadas de las frecuencias alélicas entre poblaciones (Weir & Basten, 1990), *dxy* estima el promedio de diferencias de nucleótidos entre poblaciones por sitio y, al realizar una estimación "absoluta" de diferenciación, es menos sensible que *Fst* a las reducciones genómicas de diversidad. Los cálculos de *Fst* para los 21 contrastes de pares de especies se hicieron usando el programa VCFtools versión 0.1.16 (Danecek et al. 2011). En cambio, los cálculos de *dxy* se realizaron usando el programa Pixy versión 0.95.02 (Korunes & Samuk 2021). Este programa permite calcular *dxy* en presencia de datos faltantes o usando archivos VCF que no contienen sitios invariantes (como ocurre con el dataset de esta tesis) sin ningún sesgo ya que no asume que los genotipos faltantes son homocigotas (como sí ocurre con otros programas que estiman *dxy*, (Korunes & Samuk 2021).

Es importante señalar sin embargo que los contrastes de pares de especies para calcular *dxy* se hicieron usando ventanas de 25kb ya que las ventanas de 5kb mostraron un porcentaje elevado de datos faltantes. Los cálculos estimados en ventanas de 25kb tuvieron ~2% de Ns.

En concreto, como estimadores de divergencia genómica se usaron seis variables diferentes. En primer lugar, se tomaron dos variables calculadas en el análisis de diferenciación genética entre las especies (ver **Sección 2.2.3**): el promedio *Fst* global entre los genomas de los 21 pares de especies contrastadas y el porcentaje de ventanas de 5kb elevadas (con *Fst* ≥ 0,2) para esos mismos 21 contrastes. Por otro lado, se sumaron cuatro variables más: la media y la mediana de los valores de *Fst* para todas las ventanas de 5kb entre los pares de especies contrastados, y la media y la mediana de los valores de *dxy* para todas las ventanas de 25kb para los contrastes de pares de especies.

Para analizar la diferenciación en la coloración del plumaje se consideraron los seis parches de plumaje principales en los que se diferencian los capuchinos (cabeza, nuca, espalda, rabadilla, abdomen y garganta; ver **Figura 2.9**) y se contó el número de parches en los que difiere cada par de especies de capuchino contrastado tomando como referencia la **Figura 1.4**. La relación entre los estimadores de divergencia genómica y la diferencia en los parches del plumaje se determinó a través de pruebas de Mantel usando el programa ade4 versión 1.7.16 (Thioulouse et al. 2018). Los resultados se representaron gráficamente con el programa ggplot2 versión 3.3.5 (Wickham 2016) en R versión 4.0.3.

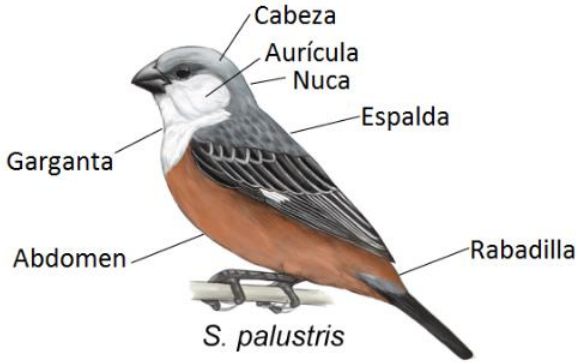


Figura 2.9: Parches del plumaje diferenciados en los capuchinos del sur (indicados en una ilustración de *S. palustris*). En esta tesis no se estudió la coloración de las aurículas por poseer en todas las especies de capuchinos excepto en *S. melanogaster* el mismo fenotipo de color que la garganta. Por ese motivo se estudiaron 6 parches. Ilustración por Jillian Ditner.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. DIFERENCIACIÓN DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR EN BASE A TODOS SUS SITIOS DIVERGENTES

En una primera aproximación, para analizar si se pueden distinguir las siete especies de capuchinos del sur del set de datos mediante el uso de todos sus sitios divergentes se realizó un PCA basado en 30.659.575 SNPs (de los 31.998.877 SNPs totales del set de datos se descartaron 1.339.302 por ser monomórficos o poseer sitios indefinidos -Ns), cuyo resultado puede verse en la **Figura 2.10**. Este análisis permitió distinguir principalmente a *S. iberaensis* del resto de las especies, exhibiendo resultados concordantes con los observados en las filogenias realizadas por Turbek et al. (2021) en donde se mostró que *S. iberaensis* es un grupo visiblemente definido dentro los capuchinos del sur (ver Figura 6 de dicho trabajo). El análisis también evidenció un alto grado de solapamiento entre *S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. nigrorufa*, así como entre *S. pileata* y *S. melanogaster*. Sin embargo, como ocurrió en los análisis de Campagna et al. (2017) la variación explicada por los primeros dos componentes principales resultó muy baja (PC1= 1,44% y PC2= 1,30%) sugiriendo que solo un puñado de regiones del genoma son las que diferencian a las especies del grupo.

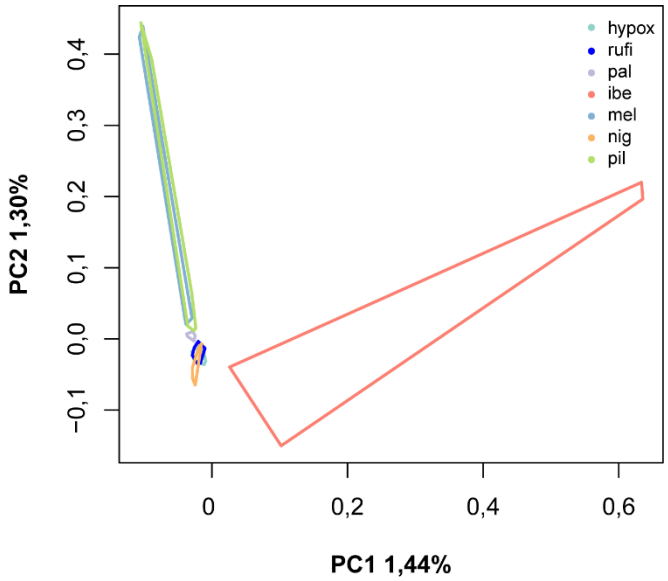


Figura 2.10: PCA construido en base a todos los SNPs del set de datos de 7 especies de capuchinos del sur. Se usaron 30.659.575 SNPs pertenecientes a 109 individuos de las siete especies de capuchinos del sur estudiadas en este capítulo. Cada especie se identifica con un color, especificado en la referencia dentro de la figura (hypox: *S. hypoxantha*, rufi: *S. ruficollis*, pal: *S. palustris*, ibe: *S. iberaensis*, mel: *S. melanogaster*, nig: *S. nigrorufa* y pil: *S. pileata*).

2.3.2. CONTRASTES DE PARES DE ESPECIES: DIVERGENCIA GENÓMICA

Los 21 contrastes de pares de especies mostraron que la divergencia genómica de los capuchinos del sur es muy baja, un resultado concordante con los análisis genómicos realizados antes de esta tesis (Campagna et al. 2017). El porcentaje promedio de ventanas genómicas de 5kb de divergencia elevada (valores *Fst* promedio ≥ 0,02) entre todos los contrastes fue 0,016% (SD = 0,014; ~200 mil ventanas en total), mientras que el *Fst* global promedio fue de 0,0036 (SD = 0,0025). Tal como reportaron Campagna et al. (2017), *S. nigrorufa* y *S. melanogaster* (dos especies sin solapamiento geográfico y con rangos de distribución altamente restringidos, ver **Figura 1.3**) resultaron ser el par de especies con un mayor porcentaje de ventanas de divergencia y con valores más elevados de *Fst* promedio (0,056% y 0,008 respectivamente; **Figuras 2.11** y **2.12**). En contraposición, los contrastes que mostraron el menor porcentaje de ventanas elevadas involucraron exclusivamente a *S. hypoxantha, S. ruficollis, S. palustris* y *S. iberaensis* (las cuatro especies con un alto solapamiento geográfico en el noreste argentino que son el foco principal de esta tesis, ver **Figura 1.3** y *ebird.org* para *S. iberaensis*). De hecho, el contraste *S. hypoxantha* vs *S. ruficollis* fue el que mostró menor divergencia genómica en relación al porcentaje de ventanas de divergencia elevada (0,001%), seguido por los contrastes de *S. hypoxantha* vs *S. iberaensis* y *S. ruficollis* vs *S. iberaensis* (0,002% en ambos casos). Respecto a las estimaciones de *Fst* promedio, los contrastes *S. hypoxantha* vs *S. palustris* y *S. hypoxantha* vs *S. ruficollis* mostraron valores nulos de divergencia (*Fst*= 0), a estos les siguió el contraste de *S. palustris* vs *S. ruficollis* (*Fst*= 0,0002).

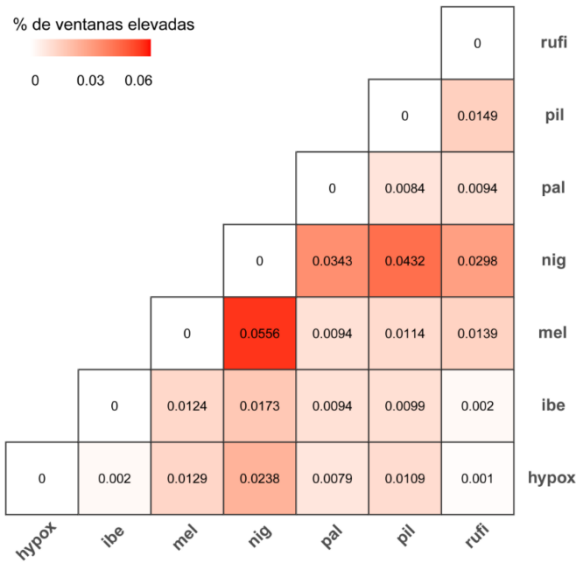


Figura 2.11: Gráfico de calor (*heatmap*) presentando el porcentaje de ventanas de divergencia elevada para los 21 contrastes de pares de especies realizados (siete especies; ~200 mil ventanas). Dentro de las celdas se indica el porcentaje de ventanas de divergencia elevada (*Fst* promedio ≥ 0,02) hallado para cada contraste de especies. En un gradiente de blanco a rojo, el color de las celdas representa el porcentaje de ventanas de divergencia elevada de forma creciente (indicado en la escala, blanco= 0% y rojo= 0,06%). Los nombres de las especies siguen los códigos de la **Figura 2.10**.

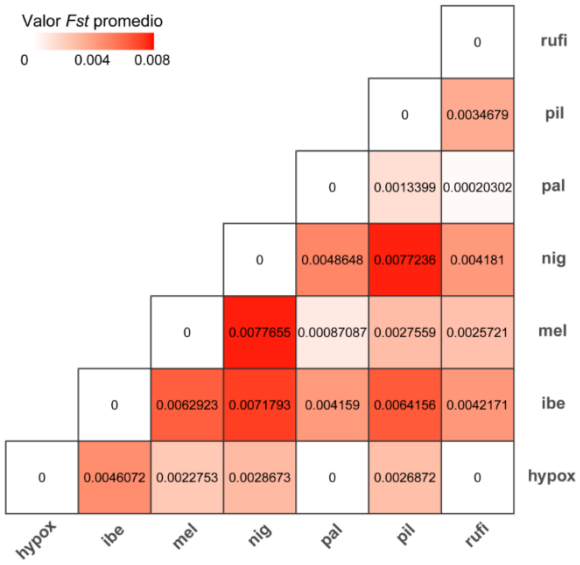


Figura 2. 12: Gráfico de calor (*heatmap*) presentando el valor *Fst* promedio global para cada uno de los 21 contrastes de pares de especies realizados (siete especies; ~200 mil ventanas). Dentro de las celdas se indica el valor de *Fst* promedio hallado para cada contraste de especies. En un gradiente de blanco a rojo, el color de las celdas representa el valor de *Fst* promedio creciente (indicado en la escala, blanco *Fst* = 0 y rojo *Fst* = 0,008). Los nombres de las especies siguen los códigos de la **Figura 2.10**.

2.3.3. CONTRASTES DE PARES DE ESPECIES: PICOS DE DIVERGENCIA GENÓMICA

Se encontraron en total 32 regiones de divergencia genómica que cumplieron con al menos uno de los dos criterios establecidos en la metodología para para definir picos de divergencia (**Tabla Suplementaria 2.1**). Sin embargo, sólo 15 de dichas regiones reunieron ambos requisitos para ser considerados picos de divergencia entre las siete especies de capuchinos contrastadas (**Tabla 2.2**). Los picos de divergencia encontrados en este capítulo coinciden con picos reportados por Campagna et al. (2017), no obstante, se encontraron 10 picos de divergencia menos que los hallados allí (ver Tabla 1 en Campagna et al. 2017). Esto último habría ocurrido por la incorporación al análisis de secuencias de *S. hypoxantha* que fueron heterocigotas para las regiones genómicas comprendidas en dichos picos de divergencia.

Los picos de divergencia genómica se repitieron a través de los 21 contrastes de pares de especies en diferentes combinaciones (**Tabla 2.2**). El número de picos de divergencia varió desde cero para los contrastes *S. hypoxantha* vs *S. palustris* y *S. iberaensis* vs *S. ruficollis*, hasta seis picos de divergencia para *S. melanogaster* vs *S. nigrorufa* y *S. pileata* vs *S. nigrorufa*. El tamaño promedio de los picos de divergencia fue de 58,5 kb (SD = 101 kb), el pico de divergencia más pequeño (0,28 kb) se observó en el *scaffold* 308 (cromosoma desconocido) para el contraste *S. nigrorufa* vs *S. palustris* y el de mayor tamaño (494,46 kb) en el *scaffold* 404 (pico "a" de dicho *scaffold*; cromosoma Z) para el contraste *S. nigrorufa* vs *S. pileata* (**Tabla 2.2**). En relación con las nuevas comparaciones de capuchinos del sur reportadas en este capítulo tras incluir a *S. ruficollis* y *S. iberaensis* (ver contrastes señalados con * en la **Tabla 2.2**), se encontró que el tamaño de los picos de divergencia varió desde 1,28 kb en el *scaffold* 308 (cromosoma desconocido) para el contraste *S. iberaensis* vs *S. pileata*, hasta 368,81 kb en el *scaffold* 257 (pico "b" de dicho *scaffold*; cromosoma Z) para el contraste *S. iberaensis* vs *S. palustris.* Los picos de divergencia en los *scaffold*s 252 (cromosoma 20) y 430 (cromosoma Z) estuvieron presentes en la mayor cantidad de contrastes de pares de especies (11 y diez de los 21 contrastes respectivamente; **Tablas 2.2** y **2.3**). Así mismo se notó que los cromosomas Z (cromosoma sexual) y 1 (cromosoma autosómico) albergaron la mayor cantidad de picos de divergencia (cinco y tres picos respectivamente; **Tablas 2.2** y **2.3**).

En total entre los picos de divergencia genómica se hallaron 1239 SNPs con valores de *Fst* individuales iguales o mayores que 0,85; pero solo 135 de los mismos estuvieron fijados (*Fst* = 1; **Tabla 2.2**). El par de especies *S. melanogaster* vs *S. nigrorufa*, que como se comentó arriba no se solapan geográficamente y tienen dos de los rangos de distribución más reducidos de los capuchinos del sur (ver **Figura 1.3**), contó con la mayor cantidad de SNPs con valores individuales de *Fst* altamente significativos (185 SNPs) y también con el mayor número de SNPs fijados (56 SNPs; **Tabla 2.2**), lo cual es consistente con que haya sido el par de especies con mayor divergencia genómica (ver sección anterior). Respecto a los nuevos contrastes de pares de especies incorporados aquí, el contraste *S. nigrorufa* vs *S. ruficollis* presentó la mayor cantidad de SNPs con valores individuales de *Fst* altamente significativos (88 SNPs) y el mayor número de SNPs fijados (12 SNPs; ver contrastes señalados con * en la **Tabla 2.2**). Estas dos especies poseen una distribución geográfica parcialmente solapada durante su temporada reproductiva (ver **Figura 1.3**), pero difieren en la coloración de todos los parches del plumaje (ver **Figura 1.4**).

Tabla 2.2: Regiones de divergencia genómica encontradas al contrastar los genomas completos de las siete especies de capuchinos del sur estudiados en este capítulo (109 individuos, 21 contrastes en total). Se reportan todos los picos de divergencia de cada contraste entre pares de especies, su posición, cromosoma, punto exacto de inicio y final del pico, posición del SNP con *Fst* ≥ 0.85 más cercano a cada extremo, tamaño total del pico en kb, cantidad de posiciones variables con *Fst* > 0.85 en cada pico, cantidad de esos SNPs con diferenncias fijas entre las especies y el *Fst* promedio entre las especies más alto.

Contraste	*Scaffold*	Cromosoma	Ventana de 5kb inicial	Ventana de 5kb final	SNP ≥ 0.85 5'	SNP ≥ 0.85 3'	Tamaño del pico (kb)	SNPs con *Fst* ≥ 0.85	SNPs fijados	*Fst* promedio más alto
hypox vs ibe*	430	1	11025001	11070000	11027576	11067689	40,11	41	0	0,23
hypox vs mel	252	20	465001	475000	461307	474102	12,80	21	0	0,33
	430	1	11025001	11045000	11026127	11047843	21,72	24	1	0,22
	1717	4	930001	955000	937441	948842	11,40	10	0	0,45
hypox vs nig	252	20	450001	485000	452406	482101	29,70	6	0	0,23
	579	1	75001	400000	105766	184334	78,57	3	0	0,49
	762	11	1675001	1685000	1675116	1693117	18,00	55	7	0,27
	3622	1	810001	1305000	925046	1313344	388,30	7	0	0,38
hypox vs pal	-									
hypox vs pil	252	20	450001	495000	452723	493873	41,15	52	0	0,41
	308	Desconocido	90001	110000	107076	108360	1,28	5	0	0,36
hypox vs ruf*	430	1	11040001	11070000	11041163	11069932	28,77	13	0	0,23
ibe vs mel*	252	20	455001	475000	457501	474102	16,60	20	3	0,33
	257 (a)	Z	21650001	24815000	21654974	21686672	31,70	18	0	0,36
	1717	4	935001	955000	938281	952914	14,63	26	0	0,52
ibe vs nig*	257 (a)	Z	21660001	28705000	21661528	21692881	31,35	5	0	0,22
	430	1	11025001	11070000	11027082	11067987	40,91	50	0	0,32
ibe vs pal*	257 (b)	Z	24425001	24815000	24452213	24811020	358,81	7	0	0,27
	430	1	11025001	11070000	11027082	11067987	40,91	49	0	0,28
ibe vs pil*	308	Desconocido	90001	110000	107076	108360	1,28	5	0	0,34
	404 (a)	Z	5185001	5680000	5490043	5678465	188,42	7	0	0,28

	1717	4	935001	955000	942606	951535	8,93	7	0	0,42
ibe vs ruf*	-									
mel vs nig	252	20	420001	485000	422050	479024	56,97	76	39	0,65
	257 (a)	Z	21660001	21674547	21660541	21674547	14,01	14	0	0,24
	404 (a)	Z	5415001	5510000	5426205	5511041	84,84	8	1	0,29
	412	1A	3425001	3455000	3425221	3453466	28,25	9	1	0,22
	430	Z	11025001	11045000	11027576	11044821	17,25	17	1	0,28
	762	11	1665001	1690000	1666833	1689934	23,10	61	14	0,37
mel vs pil	252	20	420001	495000	422050	493873	71,82	121	20	0,57
mel vs pal	252	20	425001	475000	425093	474102	49,01	32	6	0,38
	430	Z	11025001	11045000	11027576	11044821	17,25	16	1	0,24
mel vs ruf*	252	20	420001	475000	424921	471271	46,35	25	4	0,36
	257 (a)	Z	21655001	24445000	21660208	21674547	14,34	14	0	0,34
	1635	6	3720001	3730000	3723260	3725209	1,95	7	0	0,31
	1717	4	930001	955000	934113	952914	18,80	22	0	0,51
nig vs pal	118	2	7165001	7175000	7171074	7173904	2,83	7	1	0,41
	257 (b)	Z	24405001	24470000	24417282	24468740	51,46	11	1	0,37
	308	Desconocido	105001	110000	108067	108347	0,28	6	0	0,40
	404 (a)	Z	5215001	5540000	5219145	5537807	318,66	16	2	0,33
nig vs pil	252	20	445001	505000	454524	495023	40,50	45	5	0,49
	404 (a)	Z	5175001	5510000	5184152	5678609	494,46	41	11	0,42
	404 (b)	Z	10745001	10920000	10745500	10866268	120,77	8	1	0,31
	412	1A	3405001	3475000	3405519	3431674	26,16	21	2	0,37
	567	2	2670001	2720000	2704885	2717594	12,71	6	0	0,37
	1717	4	935001	955000	938281	951535	13,25	6	0	0,40
nig vs ruf*	404 (a)	Z	5180001	5490000	5216766	5219587	2,82	5	0	0,34
	430	1	11040001	11085000	11042692	11079861	37,17	46	0	0,32
	762	11	1675001	1690000	1667579	1689934	22,36	37	12	0,33

pal vs pil	252	20	450001	495000	452723	493873	41,15	25	0	0,34
	404 (a)	Z	5185001	5195000	5186953	5192367	5,41	5	0	0,29
	430	1	11060001	11070000	11061491	11063959	2,47	6	0	0,23
pal vs ruf*	257 (b)	Z	24410001	24470000	24429207	24468740	39,53	6	0	0,31
	430	1	11040001	11070000	11041309	11069932	28,62	39	1	0,31
pil vs ruf*	252	20	450001	495000	452723	493873	41,15	44	1	0,37
	1717	4	940001	955000	942465	951535	9,07	6	0	0,39

*Los pares de especies contrastados se encuentran ordenados alfabéticamente y los *scaffold*s en los que se encontraron los picos de divergencia se ordenaron de menor a mayor.

[#] Los contrastes de pares de especies que involucraron a *S. ruficollis* y *S. iberaensis* se señalan con un asterisco (*) junto al nombre del contraste.

2.3.4. DIFERENCIACIÓN DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR EN BASE LOS PICOS DE DIVERGENCIA GENÓMICA

Se realizó un nuevo PCA basado esta vez únicamente en el conjunto de SNPs contenidos en los picos de divergencia que surgieron en al menos dos contrastes de pares de especies. Es decir, se analizaron específicamente las zonas genómicas de divergencia entre las especies. De esta forma se utilizó únicamente la información contenida en los picos de divergencia ubicados en los *scaffold*s 252, 257 (a y b), 308, 404 (a y b), 412, 430, 762 y 1717 (**Tabla 2.3**). Este PCA se basó en 140.764 SNPs (no monomórficos y sin Ns) y mostró resultados similares a los encontrados en el PCA basado en todos los SNPs del genoma, arrojando un poco más de resolución a las relaciones entre las especies. Nuevamente se observó a *S. iberaensis* sin superposición con el resto de los capuchinos en el espacio delimitado por los primeros dos componentes principales. Lo mismo ocurrió con *S. palustris*, una especie con rango de distribución medianamente restringido, aunque la misma se situó en el PCA muy cerca de *S. hypoxantha*, una especie con la que comparte completamente su rango de distribución (es decir que la distribución de la primera está contenida dentro de la de la segunda; ver **Figura 1.3**) y con la que solo difiere en su patrón de coloración en el parche de la garganta (blanco en *palustris* y canela en *hypoxantha*; **Figura 2.8**). Este PCA además consiguió diferenciar mejor (aunque con solapamiento) a *S. melanogaster* de *S. pileata*. No obstante, la varianza explicada por los primeros dos componentes del análisis aumentó muy poco respecto al PCA basado en todos los SNPs del genoma y continuó siendo muy baja (PC1 = 2,08% y PC2 = 1,82%).

Prestando especial atención a los picos de divergencia encontrados en los contrastes que involucraron a *S. ruficollis* y *S. iberaensis* (las dos especies de capuchinos que no habían sido incorporadas en los análisis previos) se complementaron los resultados reportados en la **Tabla 2.3** y en la **Figura 2.13** realizando PCAs individuales de los picos de divergencia que surgieron en los contrastes que involucraron específicamente a alguna de estas dos especies. En general, se encontró que la variabilidad explicada por los dos primeros componentes aumentó al restringir los análisis solo a picos individuales de divergencia (**Figura 2.14**). Los PCAs de picos individuales mostraron relaciones similares a las halladas por Campagna et al. (2017).

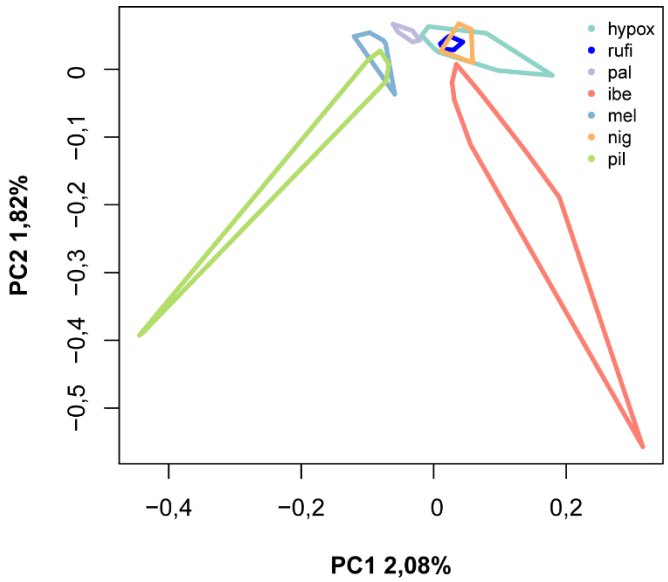
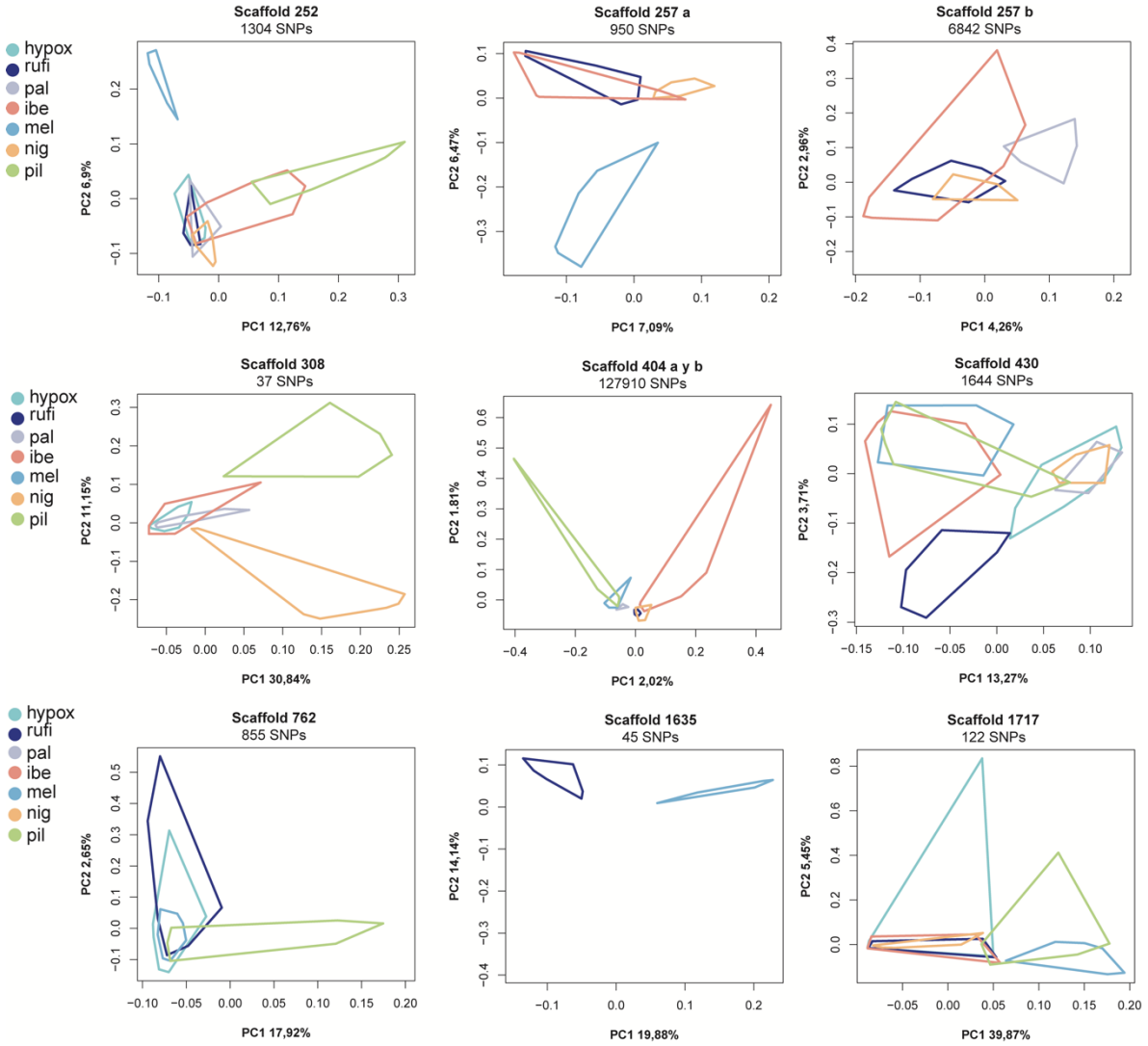


Figura 2.13: PCA construido en base los SNPs contenidos en los picos de divergencia genómica que existen entre las especies. En total se usaron 140.764 SNPs (109 individuos, siete especies). Otros detalles como en la **Figura 2.10**.

Haciendo hincapié solo en los contrastes de pares de especies que involucraron a estas dos especies, en varios picos de divergencia (como los contenidos en los *scaffold*s 252, 257 y 1717) *S. ruficollis* y *S. iberaensis* se agruparon juntas, distinguiéndose de *S. melanogaster* en los picos de los *scaffold*s 252 y 257a, y de *S. palustris* en el pico del *scaffold* 257b (**Figura 2.14**). En cambio, en el pico del *scaffold* 430 se ubicaron en diferentes grupos. Así mismo, *S. ruficollis* y *S. iberaensis* se agruparon con otras dos especies del grupo con las que poseen mayor solapamiento geográfico en el noreste argentino (*S. hypoxantha* y/o *S. palustris*) en varios picos (*scaffold*s 252, 308 y 1717); aunque en otros se hallaron notablemente diferenciadas (como en los picos de los *scaffold*s 404 y 430; **Figura 2.14**). Algo similar se observó para las especies geográficamente aisladas y de distribución restringida (como *S. melanogaster* y *S. nigrorufa*). Estas especies se distinguieron del resto en algunos picos (como *S. melanogaster* en el pico del *scaffold* 252 y *S. nigrorufa* en el pico del *scaffold* 308), pero se agruparon con varias especies en otros (como sucedió en los picos de los *scaffold*s 430 y 1717; **Figura 2.14**). Estos resultados, sumados a los de las secciones anteriores, sugieren que los picos de divergencia observados entre las especies no dependerían de la relación entre sus distribuciones y solapamiento (como uno podría esperar si hubiese un intenso flujo génico en las zonas de simpatría), sino principalmente de las diferencias de coloración entre las especies y los atributos específicos de cada región genómica de divergencia y los genes presentes en estas regiones (o ligados a las mismas). La sección siguiente explora justamente esta cuestión.



<u>Figura 2.14</u>: Gráficos de PCA individuales basados en los SNPs contenidos en los picos de divergencia genómica de los contrastes que involucraron a *S. ruficollis* y *S. iberaensis*. Los picos se identifican de acuerdo al número de los *scaffold*s en los que se encuentran. Para mayor claridad, solo se ilustran en cada gráfico las especies que se distinguieron en dichos picos al realizar los contrastes. Otros detalles como en la **Figura 2.11**.

2.3.5. EXPLORACIÓN DE LOS PICOS DE DIVERGENCIA ENCONTRADOS EN LOS CONTRASTES DE PARES DE ESPECIES DE LAS SIETE ESPECIES DE CAPUCHINOS

Los picos de divergencia se exploraron globalmente para los 21 contrastes de pares de especies con el objetivo de identificar los genes contenidos en ellos y sus zonas colindantes (±50 kb). Desde una perspectiva general basada en todos los contrastes realizados se observó que las regiones de divergencia más amplias se ubicaron en los *scaffold*s 404 (pico a de dicho *scaffold*, 494, 5 kb, cromosoma Z), 257 (pico b de dicho *scaffold*, 393,7 kb, cromosoma Z) y 3622 (388,3 kb, cromosoma 1). En cambio, los *scaffold*s 308 (cromosoma desconocido), 1635 (cromosoma 6) y 118 (cromosoma

2) incluyeron las regiones de divergencia más acotadas (1,3kb, 2kb y 2,83kb respectivamente; **Tabla 2.3**). En total se hallaron 71 genes en los picos de divergencia y sus regiones colindantes. De ellos, 54 tienen funciones conocidas (en algunos casos en aves y en otros en estudios previos de otros grupos taxonómicos) y 17 tienen funciones desconocidas (**Tabla 2.3**)

Varios resultados destacan el rol prominente de los genes relacionados con la coloración en la diferenciación entre las especies del grupo. En primer lugar, siete de los 15 picos de divergencia encontrados contienen o están cerca de genes vinculados con la melanogénesis u otros aspectos de la coloración, incluyendo un total de diez de dichos genes. La lista de genes y su función se detalla en la **Tabla 2.3**. Todos estos genes han sido señalados repetidamente en otros sistemas avianos de divergencia reciente que difieren también en caracteres de coloración (Uy et al. 2016, Toews et al 2016, Stryjewski et al. 2017, Abolins-Abols et al. 2018). Además, los picos de divergencia genómica que se observan con mayor frecuencia entre los contrastes de especies son justamente los que incluyen genes de la melanogénesis (**Tabla 2.3**). Por ejemplo, el pico del *scaffold* 252 apareció en 11 de los 21 contrastes y además presentó el valor promedio de *Fst* por ventana más alto (0, 88). Este pico contiene al gen *ASIP*, un gen conocido de la melanogénesis que induce la producción de feomelanina (generando la expresión de tonalidades rojizas y amarillentas en las plumas) en lugar de eumelanina (que otorga tonalidades marrones oscuras y negras; Oribe et al. 2012). Por último, todos los contrastes de pares de especies en los que se observaron picos de divergencia genómica involucraron por lo menos un pico asociado directamente con la melanogénesis (**Tablas 2.2** y **2.3**).

Cabe destacar que más allá de los numerosos genes vinculados a la coloración, se encontraron otros genes (44 en total) que poseen funciones conocidas no relacionadas con el color del plumaje, sino con otras funciones o caminos metabólicos, como por ejemplo la vía de señalización de receptores de andrógenos (gen *DNAJA1*; *scaffold* 762), el desarrollo de la córnea (*COL8A1*; *scaffold* 3622) y la señalización cerebral (*NETO2*; *scaffold* 762). Investigar en profundidad esta diversidad de funciones encontradas en los genes no asociados a coloración excede los tiempos y los objetivos de esta tesis, por lo que los resultados que se reportan aquí se concentraron en describir fundamentalmente la funcionalidad de aquellos genes asociados con la coloración y quedan planteadas estas otras posibles diferencias entre las especies para su profundización a futuro (genes listados también en la **Tabla 2.3**).

Tabla 2.3: Picos de divergencia hallados en los 21 contrastes de pares de especies detallados a nivel global. Se indican los genes encontrados en las regiones comprendidas en ± 50kb respecto del pico y se describe la función de aquellos genes vinculados directamente con la melanogénesis o asociados a la coloración (aquellos destacados en negritas). Otros detalles como en la **Tabla 2.2**.

Scaffold	**Cromosoma**	**Tamaño del pico de divergencia (kb)**	***Fst* promedio más alto para las ventanas de 5kb**	**N° de contrastes en los que aparece**	**Genes en la región de divergencia (± 50kb)**	**Función de los genes relacionados con la melanogénesis (o la coloración)**
118	2	2,83	0,65	1	*TEX10, MSANTD3, desconocido (1)*	-
252	20	72,3	0,88	11	*EIF2S2,* ***ASIP****,* ***AHCY****, desconocido (1)*	***ASIP***: Induce a los melanocitos a sintetizar feomelanina en lugar de eumelanina. ***AHCY***: Esta asociado con la calidad de los melanocitos
257 (a)	Z	37,9	0,73	4	***TYRP1****, LURAP1L*	***TYRP1:*** Enzima fundamental para la síntesis de melanina
257 (b)	Z	393,7	0,59	3	***MLANA****, ERMP1, KIAA1432, CD274, JAK2, JAK3, RCL1, AK3, CDC37L1, desconocidos (11)*	***MLANA***: Vital para la formación de melanosomas en estadio II
308	Desconocido	1,3	0,75	3	*ELAC1, ME2*	-
404 (a)	Z	494,5	0,63	6	*CAPSL, IL7R, SPEF2, PRLR, AGXT2, DNAJC21, BRIX1, RAD1, RAI14, C1QTNF3, AMACR,* ***SLC45A2****,RXFP3*	***SLC45A2***: Importante para el transporte de sustancias durante la melanogénesis
404 (b)	Z	120,7	0,60	1	*NDUFS4, FST*	-
412	1	48	0,67	2	**-**	-
430	Z	53,7	0,63	10	***HERC2, OCA2***	***HERC2***: regula a *OCA2* ***OCA2***: transporta un precursor de la melanina durante la melanogénesis
567	2	12,7	0,75	1	*desconocido (1)*	-
579	1	78,6	0,75	1	-	-
762	11	26,3	0,68	3	*NETO2, DNAJA1, DNAJA2, GPT2, C16orf87, desconocido (1)*	-

1635	6	2	0,58	1	*ZNF703*	-
1717	4	18,8	0,77	6	*ANKRD17, ALB, RASSF6,* ***CAMK2D***	***CAMK2D***: Importante para la comunicación celular durante la melanogénesis
3622	1	388,3	0,72	1	*TBX19, SFT2D2, TIPRL, GPR161, TTF2, CPOX, ST3GAL6, COL8A1, DCBLD2, desconocidos (2)*	***TBX19, GPR161:*** No se asocian con la melanogénesis directamente, pero si se vinculan con trastornos de la pigmentación.

2.3.6. DISTRIBUCIÓN DE LOS SNPs CON VALORES DE *FST* ≥ 0,85 EN LOS PICOS DE DIVERGENCIA GENÓMICA QUE INVOLUCRARON A *S. RUFICOLLIS* Y *S. IBERAENSIS*

Más allá del análisis general de picos de divergencia con el nuevo set de datos, se examinaron en detalle aquellos picos de divergencia presentes en los nuevos contrastes realizados en esta tesis, es decir aquellos que involucraron a *S. ruficollis* y *S. iberaensis*. Complementariamente a la información proporcionada en la **Tabla 2.3,** se analizó la posición de los SNPs hallados en los contrastes de pares de especies que tuvieron valores de *Fst* ≥ 0,85.

En las regiones asociadas con la vía de la producción de melaninas los SNPs con valores de *Fst* ≥ 0,85 se distribuyeron en la mayoría de los casos cerca de genes de la melanogénesis, pero no sobre los mismos (**Figura 2.15**). Los SNPs se encontraron en regiones presumiblemente regulatorias, como sucedió en los picos de los *scaffold*s 252 y 404, o bien sobre genes que regulan genes de la melanogénesis, siendo un ejemplo varios de los SNPs encontrados en el pico del *scaffold* 430, que se ubicaron sobre *HERC2* (regulador del gen de la melanogénesis *OCA2*). Esto es consistente con lo encontrado por Campagna et al. (2017). En una menor proporción de casos, sin embargo, los SNPs se posicionaron directamente sobre los genes de la melanogénesis. Por ejemplo, varios SNPs de los contrastes *S. iberaensis* vs *S. melanogaster* y *S. ruficollis* vs *S. melanogaster* se ubicaron sobre *TYRP1* en el pico del *scaffold* 257a, y algunos SNPs de los contrastes *S. iberaensis* vs *S. palustris* y *S. ruficollis* vs *S. palutris* se encontraron sobre *MLANA* en el pico del *scaffold* 257b (ver **Figura 2.15**). Este patrón de sitios variables dentro de los propios genes también se observó para los contrastes realizados por Campagna et al. (2017) en estos mismos picos de divergencia. Sin embargo, tras explorar estos genes en detalle, los autores concluyeron que dichas posiciones se encontraban en regiones intrónicas (no codificantes), lo que podría estar ocurriendo también en este caso.

En cuanto a la distribución de los SNPs con valores de *Fst* ≥ 0,85 contenidos en los picos no vinculados con genes de la melanogénesis, los SNPs parecieron distribuirse en áreas mucho más restringidas dentro de las regiones de divergencia (algo muy evidente en los picos de los *scaffold*s 308 y 1632; **Figura 2.16**). Esto sugiere que las diferencias entre las especies se darían en estos genes en sitios mucho más específicos y menos variables de cada gen. En particular, quisiera destacar el pico del *scaffold* 762, en el cual varios SNPs del contraste *S. ruficollis* vs *S. nigrorufa* (muchos de ellos fijados, *Fst* = 1) se encontraron sobre el gen *GPT2* (y otro gen con función desconocida). *GPT2* es un gen que codifica una enzima mitocondrial que en humanos se asocia con la *discapacidad intelectual no sindrómica* (o NS-ID), un trastorno del desarrollo neuronal que afecta las capacidades cognitivas, entre ellas las relacionadas con el lenguaje (Binaafar et al. 2020). Es posible por lo tanto hipotetizar que las diferencias en esta región están relacionadas con diferencias comportamentales, quizás asociadas al canto y/o a otras características que difieren entre las especies y aún no han sido indagadas.

2.3.7. RELACIÓN ENTRE DIVERGENCIA GENOMICA Y DE COLORACIÓN EN LOS CAPUCHINOS

En primer lugar, se construyó una matriz de distancia basada en el número de parches del plumaje en los que se diferencian los pares de especies contrastados (**Figura 2.17**). *S. nigrorufa* fue la especie de capuchino que mostró mayor divergencia en la coloración de los parches de plumaje (difiriendo siempre en entre cinco y seis parches con las otras especies del grupo; **Figura 2.17**). En cambio, *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* fueron las especies que difirieron entre sí en la menor cantidad de parches del plumaje (solo se diferenciaron en el parche de la garganta; **Figura 2.17**).

Para analizar la relación entre la diferencia genómica y la diferenciación en la coloración de los parches del plumaje se utilizaron por un lado las medidas ya calculadas en la **Sección 2.12** (la comparación global de *Fst* entre genomas para los 21 contrastes de especies y el porcentaje de ventanas elevadas (con *Fst* ≥ 0,2) en dichos contrastes) y se incorporaron cuatro nuevas estimaciones de divergencia genómica: el promedio y la mediana de *Fst* que mostraron las ~200 mil ventanas de 5kb obtenidas para los 21 contrastes de pares de especies realizados y el promedio y la mediana de *dxy* que tuvieron las ~40 mil ventanas de 25 kb de dichos contrastes. El valor promedio de *Fst* de todas las ventanas de 5kb fue 0,006 (SD = 0,002), es decir que como se puede esperar fue superior al valor obtenido con el análisis global (*Fst* = 0,0036). Consistentemente, se obtuvieron

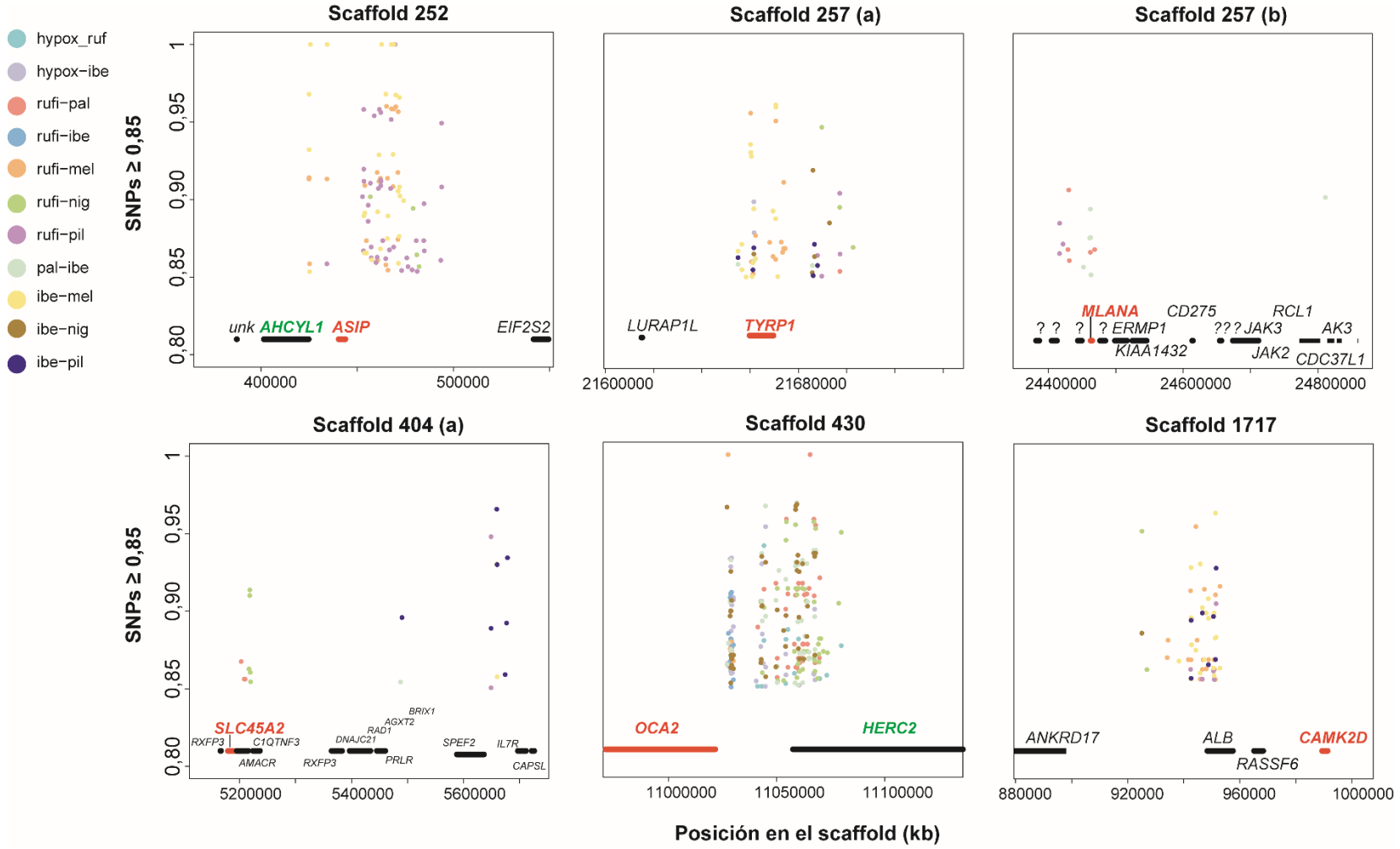


Figura 2.15: **Picos de divergencia vinculados directamente con la melanogénesis (y sus regiones colindantes ±50kb) en los contrastes que involucran a *S. ruficollis* y *S. iberaensis*.** Los puntos representan SNPs individuales con valores de *Fst* ≥ 0,85. El color de los puntos indica el contraste de pares de especies del que proviene cada SNP (ver leyenda en el extremo superior izquierdo). Los genes que participan directamente de la melanogénesis se representan en rojo, los genes vinculados con la coloración (no exactamente con la melanogénesis) se muestran en verde. El símbolo "?" hace referencia a genes con funciones desconocidas.

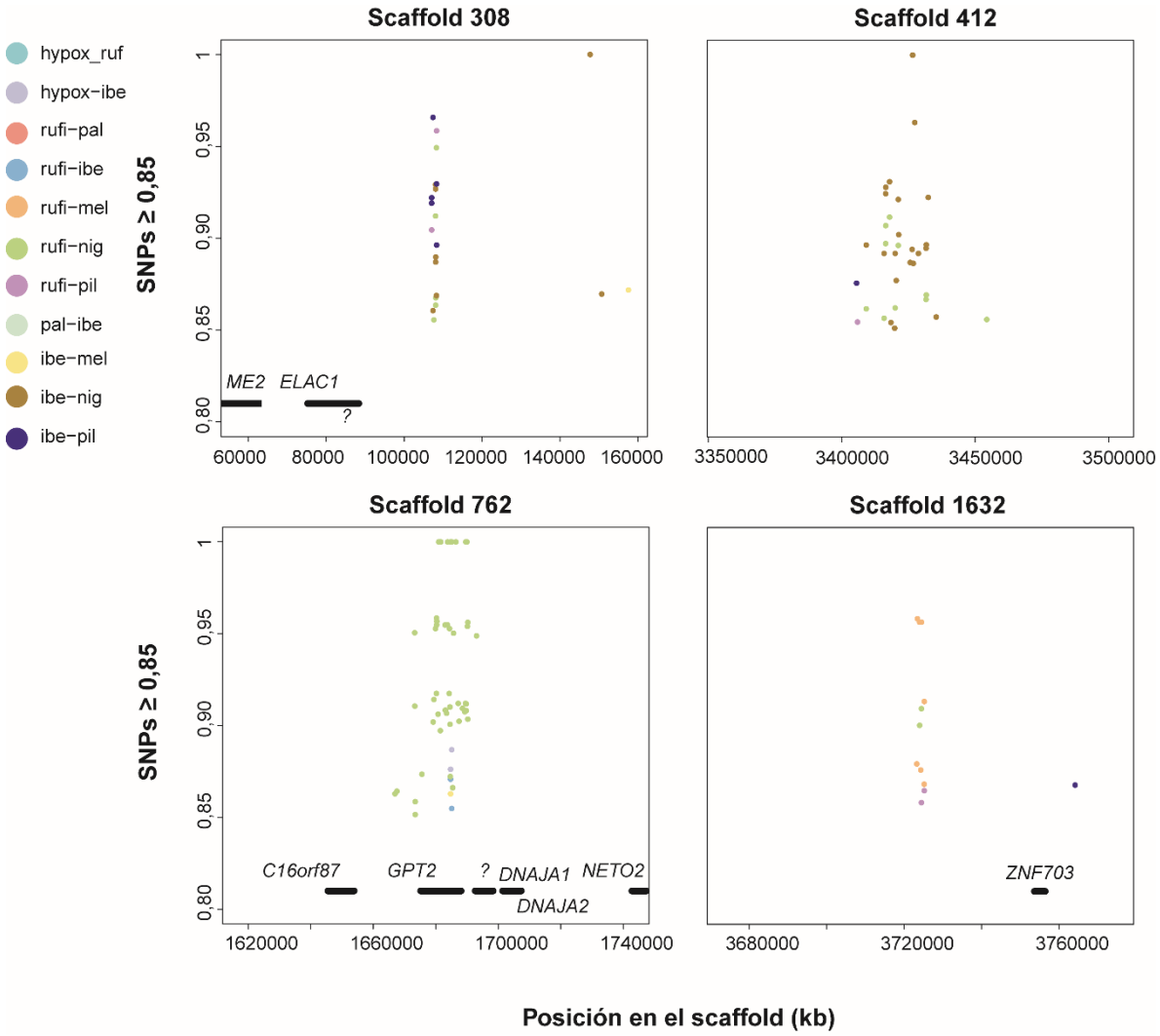


Figura 2.16: **Picos de divergencia no vinculados con la melanogénesis (y sus regiones colindantes ±50kb) en los contrastes que involucran a *S. ruficollis* y *S. iberaensis*.** Los puntos representan SNPs individuales con valores de *Fst* ≥ 0,85. El color de los puntos indica el contraste de pares de especies del que proviene cada SNP (ver leyenda en el extremo superior izquierdo). Otros detalles como en la **Figura 2.15**.

también valores levente superiores para cada contraste al considerar las ventanas a los estimados globalmente y reportados en la **Sección 2.12** (**Figura 2.18.a**; comparar con la **Figura 2.12**). La mediana de *Fst* mostró por su parte diferencias más pronunciados entre los pares de especies contrastados (**Figura 2.18.b**; comparar con la **Figura 2.12**) y un valor promedio al considerar todas las ventanas y todos los contrastes que fue menor al de la media (0,003; SD= 0,002). A pesar de estas diferencias, las relaciones se mantuvieron y el par *S. melanogaster* vs *S. nigrorufa* continuó siendo el de mayor diferenciación genómica (*Fst* promedio = 0,0098; mediana de *Fst* = 0,0068) y los contrastes *S.hypoxantha* vs *S. palustris* y *S. hypoxantha* vs *S. ruficollis* fueron los que presentaron menor diferenciación genómica (*Fst* promedio = 0,0026 y 0,0022 respectivamente y mediana de *Fst* = 0 en ambos casos; **Figura 2.18**). Finalmente, para todos los contrastes realizados el promedio *dxy* para las ~40 mil ventanas fue de 0,1130 y la

mediana de 0,1141 (SD = 0,004 para ambas estimaciones), y mostró valores individuales muy similares para todos los contrastes (**Figura 2. 19**).

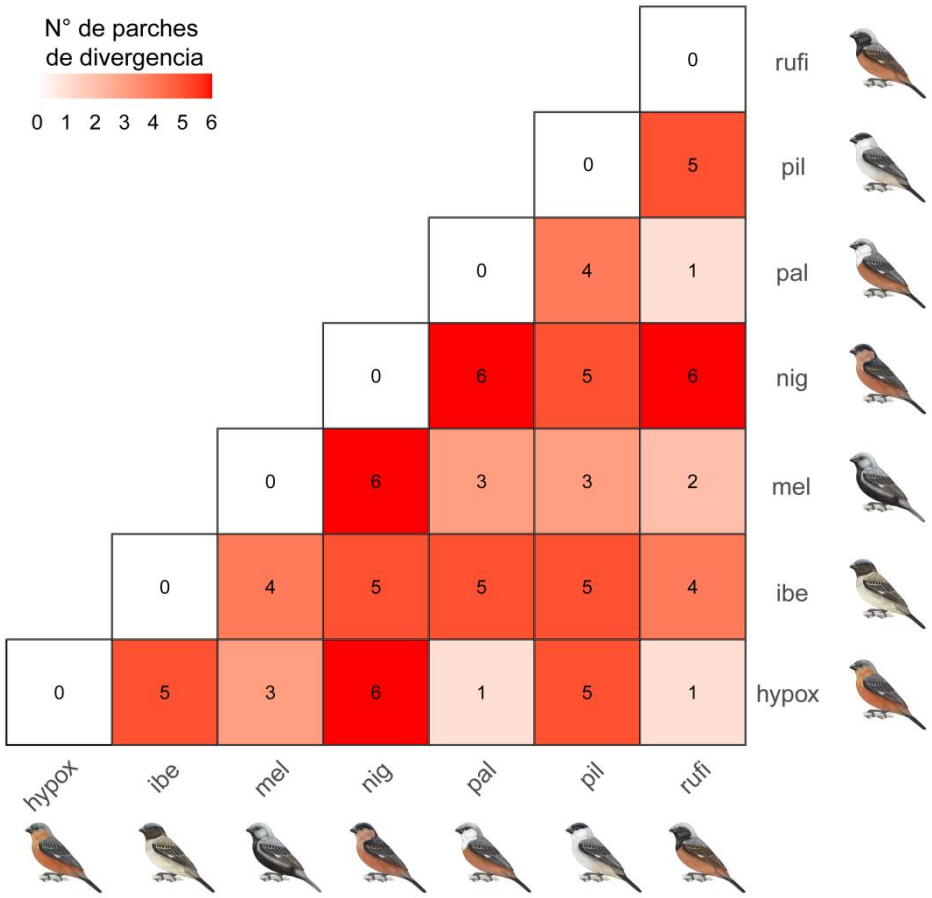


Figura 2.17: Cantidad de parches en los que se diferencian las siete especies de capuchinos del sur estudiadas en la tesis. En un gráfico tipo "*heatmap*" se muestra en cada celda la cantidad de parches del plumaje (cabeza, nuca, espalda, rabadilla, abdomen, garganta; ver Figura 2.8) en los que difieren las siete especies de capuchinos estudiadas en este capítulo cuando se contrastan de a pares. En un gradiente de blanco a rojo, el fondo de las celdas representa el número de parches diferentes en forma creciente (indicado en la escala, blanco = 0 parches diferenciados y rojo = 6 parches diferenciados). Junto a la abreviatura del epíteto específico de cada especie se muestran ilustraciones de las mismas (ver **Figura 1.4** para un mayor detalle de las mismas). Ilustraciones por Jillian Ditner.

Las pruebas de Mantel calculadas utilizando las matrices de distancias basadas en el número de parches de diferenciación entre las especies (**Figura 2.17**) y las cuatro estimaciones de divergencia genómica asociadas con el estimador *Fst* (**Figuras 2.11**, **2.12** y **2.18**) indicaron que en todos los casos la diferenciación genotípica correlaciona positivamente con la diferenciación en la coloración de los parches de plumaje ($p \leq 0,02$ en todos los casos). La correlación positiva más fuerte ocurrió al comparar la divergencia en los parches de plumaje con el valor *Fst* promedio global de cada par de especies ($r^2 = 0,73$, $p = 2e^{-04}$), mientras que la correlación menos pronunciada surgió al contrastar la divergencia en coloración con el porcentaje de ventanas elevadas en cada contraste ($r^2 = 0,56$, $p = 0,01$; **Figura 2.20**). Por el contrario, las pruebas de

Mantel calculadas en base a *dxy* para las ventanas de 25 kb de cada contraste como estimadores de distancia genómica no mostraron una correlación significativa con la coloración. De hecho, e inversamente a lo esperado, la diferenciación en los parches del plumaje y *dxy* mostraron una correlación negativa no significativa (r^2 = -0,32 para la media y r^2 = 0,33 para la mediana; p > 0,08 en ambos casos; **Figura 2.21**).

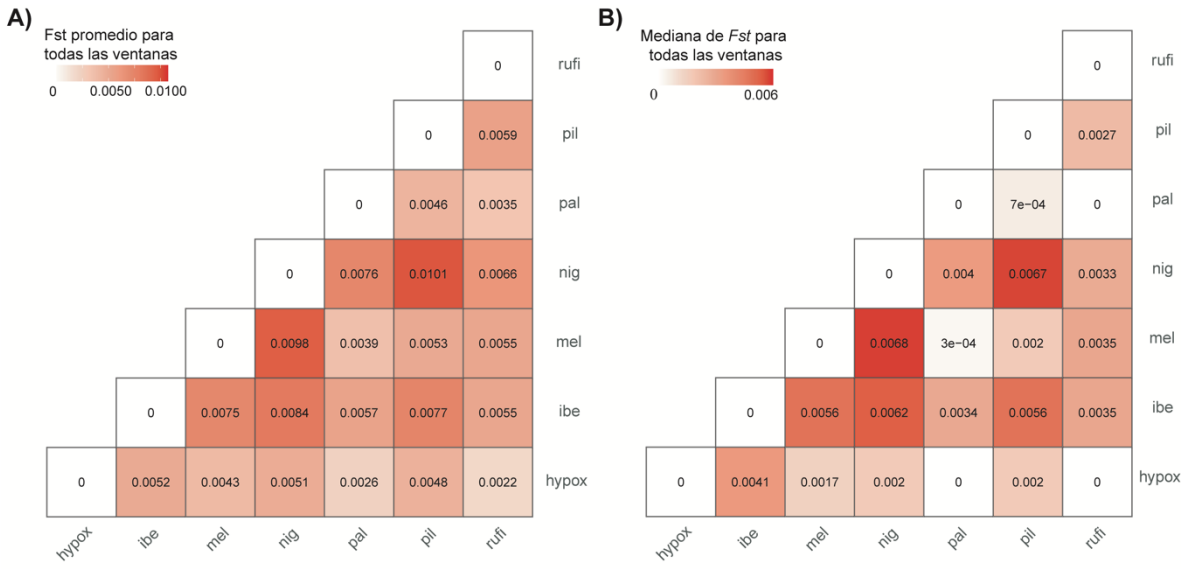


Figura 2.18: Estimaciones de *Fst* basadas en los valores *Fst* promedio obtenidos para cada ventana de 5kb contrastada (~200 mil en total) en los 21 contrastes de pares de especies realizados. (A) Se indica en las celdas el valor promedio de *Fst* que tuvieron todas las ventanas de 5kb. (**B)** Se indica en las celdas la mediana de *Fst* que tuvieron las ventanas de 5kb. Otros detalles como en la **Figura 2.17**.

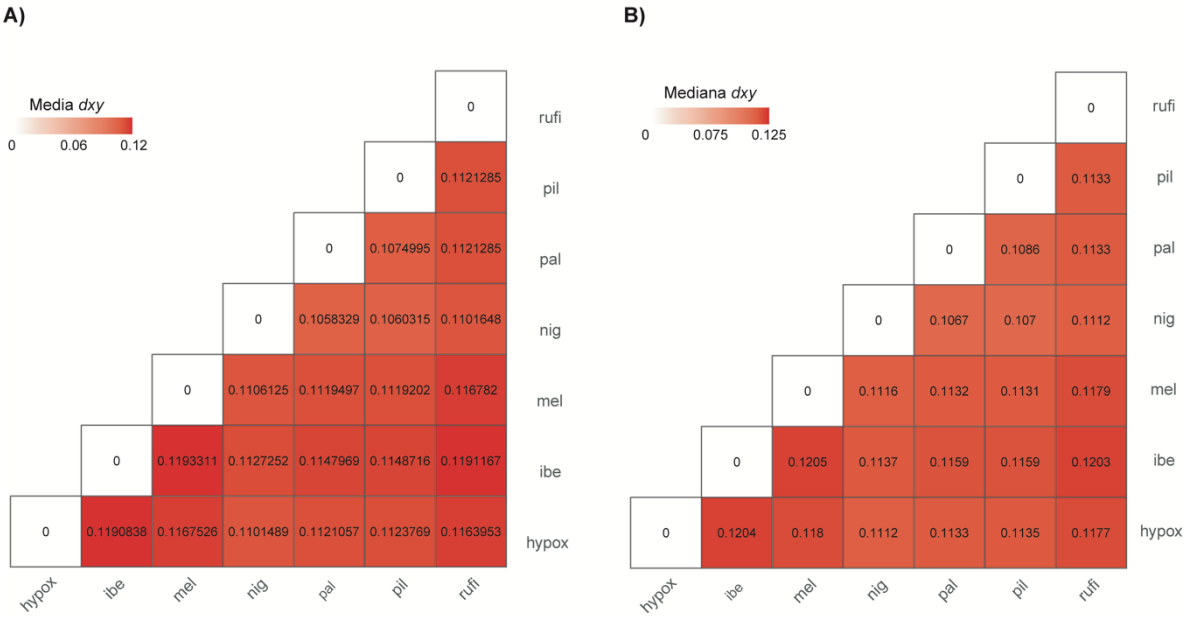


Figura 2.19: Estimaciones de *dxy* basadas en los valores *dxy* promedio obtenidos para cada ventana de 25kb contrastada (~40 mil en total) en los 21 contrastes de pares de especies realizados. (A) Se indica en las celdas el

valor promedio de *dxy* que tuvieron todas las ventanas de 25kb. (**B)** Se indica en las celdas la mediana de *dxy* que tuvieron las ventanas de 25kb. Otros detalles como en la **Figura 2.17**.

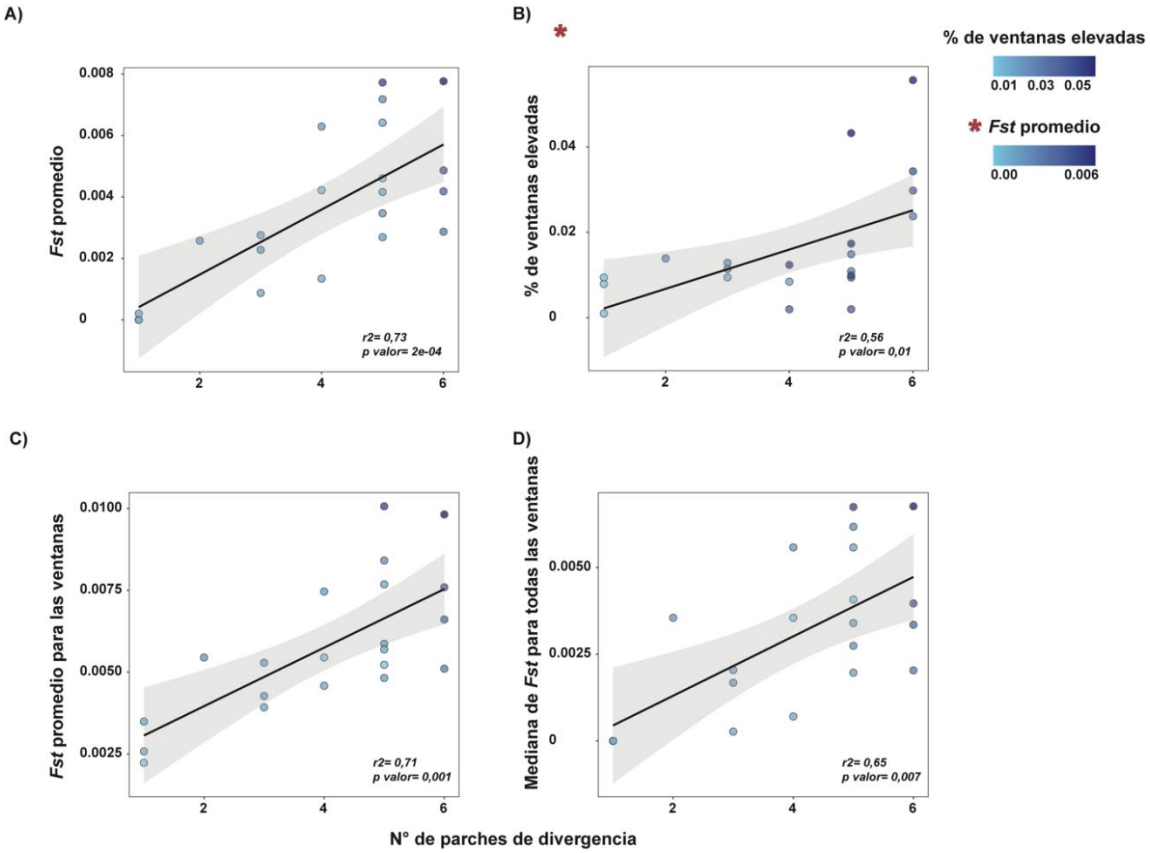


Figura 2.20: Correlación entre la divergencia genómica y la diferenciación fenotípica (coloración de los parches de plumaje). (A) Divergencia genómica estimada como el *Fst* promedio global; **(B)** divergencia genómica estimada como el porcentaje de ventanas elevadas (*Fst*≥ 0,2); **(C)** divergencia genómica estimada como el *Fst* promedio de todas las ventanas de 5kb; **(D)** divergencia genómica estimada como la media de *Fst* de todas las ventanas de 5kb. En cada gráfico de correlación se indica la dirección y fuerza de la correlación (r^2) así como la significancia de la misma (*p).* Cada punto en los gráficos representa un contraste de pares de especies. Para A, C y D Los puntos se encuentran coloreados en un gradiente cuya tonalidad depende del porcentaje de ventanas elevadas que presentó el contraste de pares de especies; en cambio para B se colorean en un gradiente cuya tonalidad depende del valor *Fst* promedio de cada contraste (señalado con un asterisco rojo).

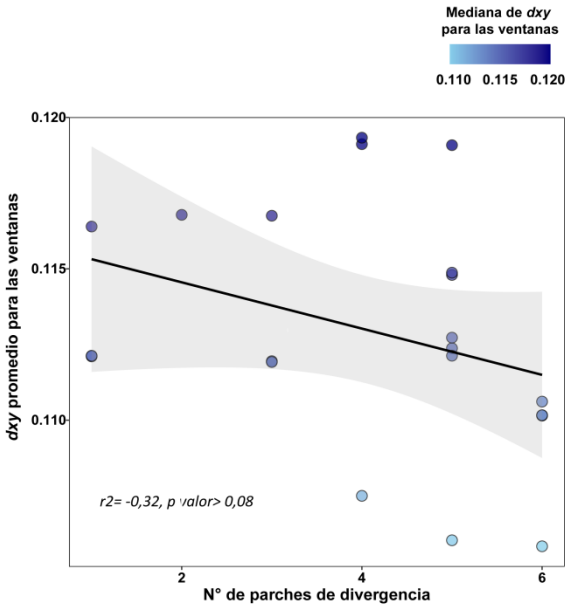


Figura 2.21: Correlación entre la divergencia genómica (estimaciones de *dxy*) y la divergencia en la coloración de los parches del plumaje. Se muestra la divergencia genómica estimada como el promedio *dxy* de todas las ventanas de 25kb (~40 mil ventanas) en cada contraste de pares de especies. Se indica la dirección y fuerza de la correlación (r^2) así como la significancia de la misma (*p).* Cada punto en los gráficos representa un contraste de pares de especies. Los puntos se encuentran coloreados en un gradiente cuya tonalidad depende del valor de mediana *dxy* para todas las ventanas de 25kb contrastadas (indicado en la leyenda).

2.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se realizaron los análisis de divergencia genómica de los capuchinos del sur más completos hasta la fecha, incorporando dos especies que no habían sido contrastadas hasta el momento (*S. ruficollis* y *S. iberaensis*), sumando nuevas secuencias de *S. hypoxantha* y realizando análisis de correlación entre la divergencia genómica y la diferenciación en la coloración de las especies.

En términos generales, los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Campagna et al. (2017), pero el mayor muestreo taxonómico y los nuevos análisis permiten ampliar las conclusiones obtenidas en aquel momento. En primer lugar, se encontró que, a pesar de poseer una marcada diferenciación fenotípica en su coloración y sus vocalizaciones, los capuchinos no pueden separarse claramente entre sí en base a su ADN ya que difieren genéticamente solo en un puñado de regiones (15 picos de divergencia en total) de tamaño pequeño (únicamente el 11% de los picos superó las 100kb). Estas regiones están mayoritariamente asociadas con genes de la coloración, ya que un 70% de los picos de divergencia incluyen genes asociados a la síntesis de melamina. Además, dichas regiones se repiten entre los diferentes contrastes de pares de especies, pero en distintas combinaciones. Por último, el contar con más especies permitió contrastar por primera vez en el grupo la

divergencia genética entre las especies con la diferenciación en la coloración del plumaje, evidenciando una clara correlación positiva entre ambos. Estos resultados y sus implicancias se dicuten en mayor detalle a continuación.

Dado que las especies de capuchinos del sur no pueden separarse en base a su ADN neutro (no presentan monofilia recíproca como resultado de su reciente divergencia y posible hibridación; Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2010, 2012, 2015), se utilizaron tres aproximaciones distintas para evaluar si era posible separarlas en base a sus genomas completos: 1) utilizando todos los SNPs del dataset (más de 30 millones de sitios variantes), 2) en base al conjunto específico de SNPs contenidos en los picos de divergencia (alrededor de 140.000 sitios variantes), y 3) utilizando cada una de las regiones de divergencia para intentar separar a las especies que justamente divergen en dicha región. Las dos primeras aproximaciones permitieron separar del resto solamente a algunas de las especies, siendo notable que *S. iberaensis*, una de las especies con distribución restringida, es la que más claramente se diferencia (ver **Figuras 2.10** y **2.13**). Es relevante tener en cuenta que *S. iberaensis* es una de las especies más muestreadas en el set de datos (21 ejemplares representados) y por ende este resultado no se debería a que específicamente se hubiesen secuenciado unos pocos individuos que por azar pudiesen presentar más diferentes respecto de las demás especies. Del resto de las especies, aquellas que tienen distribución geográfica acotada (S*. melanogaster*, *S. nigrorufa* y *S. palustris*) pudieron diferenciarse un poco más entre sí. De todos modos, y hasta cierto punto con la excepción de *S. palustris*, estas especies se superpusieron en su variación con aquellas de distribución más extensa (*S. ruficollis*, *S. hypoxantha* y *S. pileata*).

Los PCAs individuales de cada pico de divergencia genómica elevada sí permitieron en cambio separar con mayor claridad a las especies que divergen en dicha región. En este caso, las especies se separan en base a sus diferencias de coloración, y no en relación a la extensión o solapamiento de su distribución geográfica. Esto es lógico, ya que los picos justamente incluyen genes asociados a diferentes pasos de la síntesis de melanina y así las especies que se diferencian en un dado pico es esperable que se diferencien también en algún aspecto de su coloración. Esto sugiere de todos modos que la hibridación entre las especies, de existir, es acotada y que hay un rol de la selección (probablemente sexual) que permite mantener las diferencias entre las mismas.

Los resultados obtenidos confirman que las especies de capuchinos se diferencian en unas pocas regiones que constituyen islas de divergencia dentro de un "mar genómico" de muy baja

diferenciación (comparar las **Tablas 2.2** y **2.3** con las **Figuras 2.11** y **2.12**). De hecho, a pesar de haber incorporado dos nuevas especies de capuchinos del sur a los contrastes genómicos, no solo no se encontraron nuevos picos de divergencia elevada, sino que, por el contrario, se establecieron menos regiones de divergencia que las determinadas por Campagna et al 2017 (solo 15 de los 25 picos de divergencia genómica hallados originalmente; **Tabla 2.2**). Esta reducción en el número de picos de divergencia pudo haber ocurrido por haberse incorporado nuevas secuencias de *S. hypoxantha* de individuos heterocigotas para las regiones que en este trabajo no presentaron diferencias. La incorporación de heterocigotas afectaría los valores de *Fst* de los contrastes que involucraron a *S. hypoxantha* porque *Fst* es un estimador que calcula la diferencia genética entre las poblaciones en función de las frecuencias alélicas de las mismas (Weir & Basten, 1990). De hecho, en una indagación rápida de estos individuos para algunas de las regiones divergentes ausentes en este trabajo se corroboró que varios de los individuos incorporados eran heterocigotas. Por otro lado, el umbral de significancia adoptado por Campagna et al. (2017) para seleccionar ventanas elevadas fue *Fst* = 0,2, es decir levemente mayor que el estimado para el dataset de esta tesis (*Fst* = 0,19), por lo que algunas ventanas pueden haber quedado desestimadas, conllevando a la exclusión de regiones que estrictamente podrían haberse considerado divergentes. En relación con esto, es interesante señalar también que el número de regiones divergentes que cumplió con por lo menos uno de los criterios de selección establecidos en la metodología fue 2,3 veces mayor que el número de picos de divergencia que se reporta finalmente (**Tabla Suplementaria 2.1**). El 50% de dichas regiones se excluyó por no poseer al menos 5 SNPs con *Fst* individuales elevados y el 7% quedó fuera por no comprender por lo menos dos ventanas de divergencia elevadas (**Tabla Suplementaria 2.1**).

Las comparaciones entre pares de especies mostraron en cuántos y cuáles de estos 15 picos de divergencia se diferencia cada uno de ellos. De manera consistente con lo encontrado por Campagna et al. (2017), *S. melanogaster* y *S. nigrorufa* (las especies del grupo geográficamente más acotadas y distantes entre sí, ver **Figura 1.3**) fueron las que arrojaron mayor divergencia genómica (difirieron en 6 regiones genómicas y fueron las que presentaron un mayor *Fst* promedio y un mayor porcentaje de ventanas elevadas; **Tabla 2.**2 y **Figuras 2.11** y **2.12**). Por el contrario, las cuatro especies focales de esta tesis (*S. hypoxantha*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. iberaensis*), que son altamente simpátricas y en el caso de las tres primeras difieren únicamente en el color de su garganta (**Figuras 1.3** y **2.17**), fueron las que menos divergieron genéticamente. Dependiendo de la medida considerada, varían los pares de especies que presentan la menor divergencia, pero en todos los casos involucran a estas cuatro especies (**Tabla 2.2** y **Figuras 2.11** y **2.12**). En particular, dos de las comparaciones entre estas especies (el par *S. iberaensis y S.*

ruficollis y el par *S. hypoxantha* y *S. palustris*) no han presentado ningún pico de divergencia (**Tabla 2.2**), llevando a un extremo el hecho de ser las especies menos diferenciadas. Debe considerarse, de todos modos, que la ausencia de regiones definidas de divergencia en estas comparaciones se relaciona con lo mencionado en el párrafo precedente. Es decir que hay regiones diferenciadas entre estas especies, pero ninguna que cumpla los dos criterios para ser considerada formalmente una región de divergencia elevada (comparar la **Tabla 2.2** y la **Tabla Suplementaria 2.1**).

Más allá del grado de diferenciación entre las especies, es relevante analizar cuál es la posición de las regiones divergentes y qué genes incluyen. Con respecto a la ubicación de los picos de diferenciación, alrededor de un tercio los mismos se ubicó en el cromosoma sexual Z (**Tablas 2.2** y **2.3**), un resultado congruente con lo reportado por Campagna et al. (2017). Esto es consistente con la mayor tasa evolutiva presente en los cromosomas sexuales y su rol prominente en la especiación y, en particular, en el desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo (Haldane 1922, Coyne & Orr 1989, Price & Bouvier 2002, Lijtmaer et al. 2003; ver revisión extensiva en Uy et al. 2018). Es interesante destacar que si bien el rol de los cromosomas sexuales en el proceso evolutivo ha sido estudiado principalmente en el marco del desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo post-cigótico (incompatibilidades de Dobzhansky-Muller que llevan a la inviabilidad y esterilidad híbridas), en este caso los genes comprendidos dentro de los picos de divergencia se relacionan principalmente con diferencias en la coloración entre las especies, promoviendo así el aislamiento reproductivo pre-cigótico (previene el apareamiento entre individuos de diferentes especies del grupo). El mayor efecto del cromosoma Z y consiguiente importancia en la radiación de los capuchinos del sur no es sorpresivo de todos modos, dada su mayor tasa evolutiva, su supuesto rol más relevante en la evolución de genes expresados diferencialmente entre machos y hembras, y la mayor exposición de sus genes a la selección sexual (Uy et al. 2018).

En relación con la información contenida dentro de las regiones divergentes, debe destacarse que un 70% de las mismas incluía genes relacionados con la melanogénesis (*ASIP*, *OCA2*, *HERC2*, *TYRP1*, *MLANA*, *SLC45A2*, *CAMK2D*; **Tabla 2.3**), que además han sido repetidamente vinculados con la variabilidad en la coloración de aves y mamíferos (Visser et al. 2012, Toews et al. 2016, Uy et al. 2016, Abolins-Abols et al. 2018, Xu et al. 2019). Si bien este resultado en sí mismo no es novedoso respecto a lo mostrado por Campagna et al. (2017), refuerza la noción de que son justamente los genes asociados a la producción del color del plumaje los que diferencian a los

capuchinos del sur, de manera consistente con que el color sea la única característica morfológica diferente entre sus especies.

Más allá de los genes involucrados en la melanogénesis y su regulación, hubo muchos otros genes en las regiones de divergencia cuya función no se vincula con la coloración (Baxter et al. 2019; **Tabla 2.3, Figuras 2.15** y **2.16**). Las funciones de dichos genes se encuentran asociadas, por ejemplo, con el desarrollo neuronal y de las gónadas, y con diferentes vías de señalización (entre otras). Estudios futuros podrán apuntar a resolver si estos genes regulan (por ejemplo) caracteres comportamentales de los capuchinos (como el canto, o la actividad migratoria) u otro tipo de caracteres de divergencia no descriptos aún en el grupo. Alternativamente, la presencia de estos genes en los picos de divergencia podría no relacionarse con ninguna función diferenciada entre las especies, sino simplemente con la cercanía física entre los mismos y los genes de coloración (al menos en el caso de los genes incluidos en las regiones de divergencia que también poseen genes relacionados con la melanogénesis). Dado que la mayoría de los SNPs encontrados en este estudio no se ubican en los genes en sí mismos sino en zonas circundantes (ver a continuación), resolver esto no es trivial, ya que en base a los resultados del presente capítulo no es fácil saber si efectivamente existen diferencias entre las especies del grupo en la regulación de estos genes no asociados a la coloración.

La exploración minuciosa de la distribución de los SNPs con valores de *Fst* individuales elevados dentro de las regiones de divergencia reveló que los sitios variantes no se distribuyen dentro de las zonas codificantes de los genes, sino principalmente en regiones intergénicas cercanas a los mismos (**Figuras 2.15** y **2.16**). Más aún, si bien algunos SNPs significativos se ubicaron en los genes en sí mismos, estudios previos mostraron que dichas posiciones corresponden principalmente a intrones o, en caso de estar en los exones, implican cambios sinónimos (Campagna et al. 2017, Turbek et al. 2021, Capítulo III de esta tesis). Esto sugiere que las zonas diferenciadas entre las especies no corresponden a las regiones codificantes de los genes de coloración, sino a sus zonas regulatorias. Esto es muy relevante desde un punto de vista evolutivo, ya que dichas regiones tienen menos limitaciones para variar y por ende este sistema puede haber facilitado la rápida divergencia de las especies del grupo (Martin & Orgogozo 2013).

Los análisis de la relación entre la diferenciación genómica y la divergencia en la coloración de los capuchinos del sur arrojaron una correlación positiva y significativa cuando se utilizó a *Fst* como indicador de la diferenciación genómica entre las especies (**Figura 2.20**). En concreto, una mayor diferenciación genómica entre las especies se asocia con un mayor número de parches de coloración del plumaje diferentes entre los pares de especies de capuchinos del sur. Así, en

un extremo de la correlación se observan los contrastes entre *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* (las especies focales de esta tesis, que se diferencian en un único parche de color -la garganta- y que además presentan la menor divergencia genómica), y en el otro extremo los contrastes entre *S. nigrorufa* y *S. melanogaster* (las especies que difieren en la mayor cantidad de parches del plumaje y que tienen a su vez, mayor divergencia genómica). Las estimaciones genómicas basadas *dxy*, por el contrario, no fueron significativas (**Figura 2.21**). Este era un resultado esperable ya que *dxy* es un estimador muy sensible a las presiones de selección y al efecto de los barridos selectivos (Han et al. 2017), un fenómeno registrado ampliamente dentro del grupo (Hejase et al 2020). De hecho, las estimaciones en torno a *dxy* no mostraron patrones de diferenciación entre los distintos pares de especies contrastados, y tuvieron valores similares para todos ellos (**Figura2.19**).

Debe aclararse que esta correlación es de todos modos una primera aproximación al análisis de la asociación a nivel de todo el grupo entre la genética y el color, ya que no tiene en cuenta de manera concreta las distribuciones de las especies y justamente hemos visto en los resultados que éstas también pueden influir. De hecho, *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* además de diferir únicamente en la garganta poseen distribuciones ampliamente superpuestas mientras que *S. nigrorufa* y *S. melanogaster* además de ser las especies que más difieren en su coloración poseen distribuciones acotadas que no solo no se superponen, sino que son las dos distribuciones más alejadas entre sí en el grupo. Futuros análisis deberán contemplar el efecto de estas variables geográficas que pueden interferir en el análisis de la correlación entre genómica y coloración. Dichos análisis además podrían explorar la correlación entre la divergencia genómica y la diferenciación en otros caracteres morfológicos o comportamentales. Por ejemplo, sería de particular relevancia estudiar qué ocurre en este sentido con las vocalizaciones, ya que el canto es el otro carácter fenotípico fundamental para el reconocimiento de individuos homoespecíficos en el grupo (Benites et al. 2014, Turbek et al. 2021). Así, análisis que contemplen la relación entre la variación genómica y estas diferentes variables fenotípicas y geográficas podrán arrojar luz sobre el papel que han tenido los procesos biogeográficos y las diferentes presiones de selección sobre la arquitectura genómica del grupo, permitiendo además analizar en más detalle cuáles han sido los mecanismos específicos involucrados en su radiación.

Los resultados de este capítulo tomados en su conjunto, y sumados a los de los estudios anteriores (o paralelos) en el grupo (especialmente Campagna et al. 2017, Hejase et al. 2020, Turbek et al. 2021) permiten avanzar notoriamente en la comprensión de la diversificación y

evolución dentro de los capuchinos del sur y el rol de la coloración, un carácter fenotípico fundamental para el reconocimiento entre las especies del grupo (Turbek et al. 2021) que además se encuentra frecuentemente asociado con eventos de especiación en aves (Gomes et al. 2016, Price-Waldman et al. 2020). Específicamente dichos resultados plantean un escenario en el que las especies se diferencian entre sí en un puñado de islas de divergencia asociadas principalmente con genes de la melanogénesis, que emergen en diferentes combinaciones en las distintas especies del grupo. Dicha divergencia ocurre en las regiones regulatorias de los genes y muestra una asociación con el grado de diferenciación en la coloración del plumaje entre dichas especies. Estos resultados sustentan la hipótesis de que el grupo habría diversificado a partir de una población ancestral grande y altamente polimórfica, que rápidamente bajo presiones de selección (principalmente sexual) se habría diferenciado en las distintas especies del grupo. Un aspecto relevante de este sistema es que la radiación evolutiva habría transcurrido rápidamente no solo por involucrar diferencias en sitios regulatorios no codificantes, sino además por la modularidad del sistema (existe un conjunto acotado de parches que varían de acuerdo a la combinación de variantes genéticas de cada especie; Campagna et al. 2017, Turbek et al. 2021, este capítulo). Esta última permite que nuevas combinaciones de variantes (por ejemplo, por hibridación poco frecuente) generen la aparición de nuevos morfos de coloración que, a su vez, por selección sexual no se reproduzcan con los anteriores y comiencen a diferenciarse, generando eventualmente nuevas especies sin la necesidad de nuevas mutaciones y el tiempo que esto conlleva.

Como se comenta en los párrafos precedentes, para poder comprender de modo más acabado estos mecanismos evolutivos asociados a la coloración es necesario refinar algunos de los análisis y avanzar con enfoques aún no utilizados. Por ejemplo, se debe lograr definir de manera más precisa cuál es la relación entre las regiones genómicas individuales, su combinación y la coloración de los diferentes parches de plumaje de los capuchinos. Esto permitiría comprender mejor cómo es la modularidad en el sistema, cómo algunas variantes afectan unos parches y no otros y de qué genes (o sus combinaciones) dependen los diferentes colores que aparecen en cada parche puntual. Sobre esto trata justamente el próximo capítulo de la tesis.

CAPITULO III. BASE GENÓMICA DE LOS PATRONES DE COLORACIÓN DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR Y SUS IMPLICANCIAS EVOLUTIVAS

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. LA COLORACIÓN Y SU ROL EN LOS EVENTOS DE ESPECIACIÓN

La coloración tiene un papel fundamental en diversos aspectos fisiológicos de los animales, tales como la fotoprotección y la termorregulación, y contribuye de manera fundamental en un aspecto central del comportamiento: la comunicación (Cuthill et al. 2017). Debido justamente a este último rol clave, frecuentemente se encuentra en el centro de la escena en eventos de selección natural y sexual (Hill & McGraw 2006). Además de ser relevantes en la comunicación en diversos contextos, tales como la estructuración social o la indicación a los predadores sobre la toxicidad que puede tener un organismo, los caracteres de coloración tienen a menudo un rol fundamental en la elección de pareja (Kodric-Brown, 1985). Por esta razón, cuando cambian (ya sea simplemente variando o, aumentando o disminuyendo su complejidad) pueden contribuir al aislamiento reproductivo pre-cigótico (Irwin & Price 1999) e iniciar nuevos procesos de especiación (Allender et al. 2003). De hecho, en una escala macro-evolutiva, los cambios en la complejidad de los patrones de coloración pueden vincularse frecuentemente con eventos de especiación (Gomes et al. 2016) y correlacionarse con las tasas de especiación (**Figura 3.1**; Hugall & Stuart-Fox 2012, Price-Waldman et al. 2020).

3.1.2. AVANCES EN LOS ESTUDIOS DE LA COLORACIÓN ANIMAL EN LA ERA GENÓMICA

A pesar de la relevancia ecológica y evolutiva que tiene la coloración (Cuthill et al. 2017), los estudios sobre las bases genéticas de la misma se han visto limitados tradicionalmente al análisis de genes candidatos en sistemas modelo (Hubbard et al. 2010). Recientemente, las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) han hecho posible realizar estudios genómicos usando modelos silvestres que han incrementado notablemente nuestro conocimiento respecto a la base genética de colores melánicos y carotenoideos en diversos grupos taxonómicos, y especialmente en las aves (ver referencias en Funk & Taylor 2019 y en Orteu & Jiggins 2020). Para estudiar las bases genéticas de la coloración se suelen aprovechar sistemas biológicos con bajos niveles de divergencia genómica pero que poseen diferentes patrones de coloración, como por ejemplo, diferentes poblaciones de una misma especie, híbridos de especies hermanas y radiaciones evolutivas rápidas (Toews et al. 2016, Stryjewski et al. 2017, Aguillon et al. 2021, Semenov et al. 2021; ver un ejemplo en la **Figura 3.2**). Estos estudios sugieren que los cambios

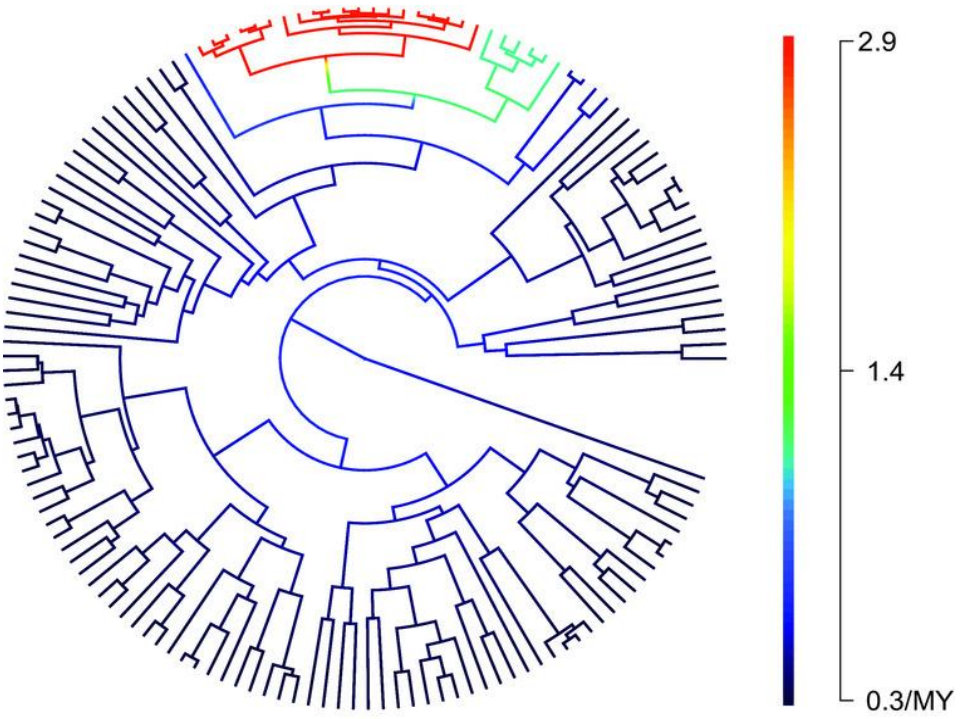


Figura 3.1: Cronograma de la familia Estrildidae. Cronograma hecho en base a 143 especies de pinzones estríldidos. Sus tasas de especiación fueron estimadas con modelos BAMM. En el subclado del género *Lonchura* (representado con ramas de colores rojizos) se observa una especiación rápida reciente y a su vez es el grupo de estríldidos que posee las tasas más altas de evolución de la ornamentación del plumaje. Imagen tomada de Gomes et al. 2016.

en diferentes regiones genómicas asociadas con el metabolismo de los pigmentos animales pueden controlar la variación de la coloración y producir caracteres nuevos durante la diversificación. En particular, hay un pequeño número de genes que aparecen implicados repetidamente en la diferenciación del color de diversos taxones (Orteu & Jiggins 2020), probablemente porque son casos en los cuales los cambios específicos en los genes en sí mismos o en sus regiones regulatorias causan pocos efectos pleiotrópicos que potencialmente puedan ser perjudiciales (Martin & Orgogozo 2013). A menudo también cambios en un solo gen (incluso por una única mutación) pueden asociarse con la variación uniforme del color en una gran porción del cuerpo o en el cuerpo entero (Nadeau et al. 2006, Uy et al. 2016). Sin embargo, se sabe mucho menos sobre cómo se originan patrones de coloración más complejos que impliquen múltiples cambios y (en ocasiones) varios colores en diferentes parches del plumaje (Orteu & Jiggins 2020, Price-Waldman et al. 2020).

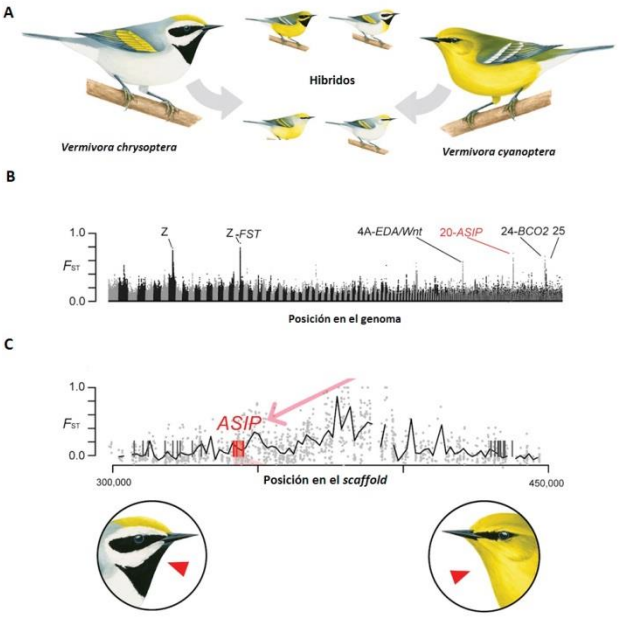


Figura 3.2: Ejemplo de un estudio que utiliza técnicas de genómica para explicar las diferencias de coloración de dos especies hermanas no modelos con una aproximación genómica (Toews et al. 2016). (A) En el estudio se contrastaron las especies *Vermivora chrysoptera* y *Vermivora cyanoptera*, considerándose también sus híbridos. **(B)** Los contrastes de genomas completos de híbridos de estas especies con sus especies parentales mostraron seis regiones de divergencia genómica elevada, cuatro de las cuales contenían genes asociados al desarrollo del plumaje. **(C)** Una de estas regiones contenía al gen *ASIP*, un gen involucrado en la melanogénesis que por los resultados se presume responsable de las diferencias de color negro y amarillo del parche de la garganta de *V. chrysoptera* y *V. cyanoptera.* Imagen tomada y modificada de Toews et al. 2016.

3.1.3. DIVERGENCIA GENÓMICA DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR Y SU VINCULACIÓN CON LOS CARACTERES DE COLORACIÓN

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, los capuchinos del sur constituyen un caso excepcional de una radiación continental explosiva y reciente, que justamente se diferencian en sus patrones de coloración a pesar de poseer muy baja divergencia genética (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2010, 2012 y 2015), resultando por ende un excelente modelo para estudiar las bases genéticas de los caracteres de coloración y el rol que tienen los mismos durante los procesos especiogénicos. En Campagna et al. (2017) y en el capítulo II de esta tesis se contrastaron genomas completos de varias especies de capuchinos del sur, encontrando que apenas un puñado de regiones genómicas tienen niveles de diferenciación altos. Estas regiones de divergencia genómica usualmente se asociaron con genes vinculados a la producción de melanina que, como demostraron Hejase et al (2020) utilizando los datos de Campagna et al. (2017), han sido moldeados por barridos selectivos especie-específicos recientes involucrados repetidamente en la diferenciación de múltiples especies de capuchinos. El hecho de que estas regiones de divergencia aparezcan en múltiples contrastes de especies (Campagna et al. 2017, Capítulo II) y que las variantes genéticas contenidas dentro de dichas regiones a menudo sean

compartidas (Turbek et al. 2021) hace suponer que la combinación de estas regiones en cada especie (y las variantes que contienen) sería la responsable de los diferentes patrones de color observados en el grupo.

Más aún, dada la modularidad del sistema se puede suponer que la reorganización de la variabilidad genética presente en estas regiones (por ejemplo por eventos de hibridación poco frecuentes) podría ser el mecanismo por el cual se generan nuevos patrones de coloración en el grupo, sin la necesidad de nuevas mutaciones. Para poder establecer esto más claramente, así como para poder comprender más cabalmente la evolución de la coloración y su rol en la radiación del grupo, es necesario poder establecer si los picos de divergencia observados entre las especies, y los genes en ellos contenidos, se asocian con cambios puntuales en el color de parches específicos del plumaje.

3.1.4. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS) PARA INFERIR LA BASE GENÉTICA DE LOS PATRONES DE COLORACIÓN EN LOS CAPUCHINOS DEL SUR

Para poder comprender la base genómica de la coloración en los capuchinos del sur y comprender mejor el rol que ha tenido en la evolución del grupo, en este capítulo se aprovechó la alta similitud genética y la variación discreta de la coloración de las especies del grupo para realizar estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés). Este tipo de análisis implica vincular variantes genómicas con cambios en el fenotipo. En este caso se analizó la asociación entre dichas variantes genómicas y la coloración de las plumas de parches específicos del plumaje de las diez especies de capuchinos, estudiada de manera cuantitativa a partir de la concentración de eumelanina (EM) y feomelanina (FM). La combinación de estas dos variantes de la melanina justamente determina la coloración de las plumas en los capuchinos, ya que la EM confiere una coloración en tonos del negro, marrón o gris, mientras que la FM genera coloraciones amarillentas y rojizas (Galván & Solano 2016).

Para realizar este análisis primero se midió la concentración de melaninas en las plumas de los diferentes parches de plumaje en todas las especies del grupo. Con esa información se estudió primero a *S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris*, tres especies que varían únicamente en la coloración de su garganta (únicos capuchinos que difieren en un solo parche de plumaje) y que constituyen 3 de las especies focales de la tesis (ver **Figura 2.9**). Se analizaron justamente en estas tres especies las regiones genómicas que determinan la coloración de la garganta. Esto permite analizar en profundidad las diferencias relacionadas con único parche específico. Posteriormente, el análisis se expandió y se llevaron a cabo análisis de GWAS para todos los

parches de coloración que muestran variaciones entre las diez especies de capuchinos del sur. Específicamente, se analizaron dos aspectos concretos y complementarios: por un lado, se estudió si los cambios en la coloración de los diferentes parches de plumaje están regulados por el mismo conjunto de genes o si cada parche está regulado en cambio por diferentes genes o diferentes combinaciones de genes, y por otro lado se analizó si un mismo parche de coloración está regulado por el mismo gen (o conjunto de genes) en diferentes especies.

3.1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO

Este capítulo tiene como objetivos generales primero determinar para cada parche de plumaje de las diez especies de capuchinos del sur la concentración de los pigmentos que dan color a sus plumas, y segundo asociar mediante GWAS variantes genómicas con los cambios de concentración de los pigmentos de cada parche entre las especies. De dichos objetivos generales se desglosan los siguientes objetivos particulares:

1) Entender la base genética de las transiciones de color de los fenotipos blanco, canela y negro del parche de la garganta para tres de las especies focales de esta tesis (*S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris*) realizando análisis de GWAS que vinculen variables genómicas con cambios en la concentración de EM y FM de dicho parche.
2) Evaluar si las variantes genéticas asociadas a un determinado fenotipo de color de garganta se repiten en otras especies de capuchinos del sur que también tengan el mismo fenotipo para dicho parche.
3) Descubrir las regiones genómicas que se asocian con los cambios en la concentración de EM y FM de todos los parches de plumaje para las diez especies de capuchinos del sur, análisis también realizado en base a GWAS.
4) Determinar cómo y dónde se distribuyen las variantes (SNPs) significativamente asociadas a los cambios en la concentración de EM y FM de los parches de plumaje en las especies de capuchinos.

En el contexto de los objetivos del capítulo y los antecedentes mencionados, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

H1) Los distintos fenotipos de color del parche de la garganta que exhiben *S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris* son el resultado de cambios en diferentes regiones del genoma.

H2) Las especies con el mismo fenotipo de color en la garganta comparten las mismas variantes dentro de las regiones genómicas asociadas a dicho parche.

H3) Las regiones del genoma que regulan la concentración de EM y FM de los parches del plumaje de los capuchinos del sur son también regiones de divergencia entre las especies del grupo.

H4) Las variantes (SNPs) genómicas significativamente asociadas a los cambios en la concentración de EM y FM de los parches de plumaje de los capuchinos se posicionan en regiones regulatorias (no codificantes), en donde los efectos deletéreos de posibles cambios son bajos (o inexistentes).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. CUANTIFICACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PIGMENTOS EN LAS PLUMAS DE LOS CAPUCHINOS

Se midió la concentración de EM y FM de plumas de machos adultos maduros de las 10 especies de capuchinos del sur. Las plumas fueron obtenidas de especímenes del Museo de Zoología de la Universidad de San Pablo (Brasil), con excepción de *S. iberaensis*, de la que no hay representantes en dicha colección (ni en ninguna otra a excepción del ejemplar tipo depositado en la Colección Nacional de Ornitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia") y por ende se midieron individuos vivos colectados en el campo y posteriormente liberados.

Se tomaron muestras de plumas de seis parches de plumaje: garganta, rabadilla, abdomen, espalda, coronilla y nuca (ver **Figura 2.9**). Estos parches representan todos los parches de coloración de los capuchinos, con la única excepción de las aurículas, que, si bien no se incorporaron al análisis porque no se contaba con plumas de las mismas, tienen la misma coloración de la garganta en todas las especies excepto en una, y por ende se espera que los genes que afectan la coloración de las aurículas y de la garganta sean difíciles de distinguir por separado. Dentro de los seis parches mencionados, las plumas de la nuca y de la espalda de *S. iberaensis* fueron las únicas que no estuvieron disponibles, por lo que su concentración de EM y FM se estimó a partir de otros parches que poseen la misma coloración: la concentración en la nuca de *S. iberaensis* se estimó a partir de la nuca de *S. nigrorufa* y la espalda de *S. iberaensis* a partir de plumas de su propia rabadilla. También se midieron estos mismos seis parches en una hembra representativa de *S. hypoxantha* a modo de comparación.

Para la medición, se colectaron varias plumas de cada parche y de ellas se conservó solo la porción distal pigmentada luego de cortarlas con un bisturí. Se requería obtener entre 5 y 15 mg de plumas para el análisis, lo que en algunos casos implicó combinar plumas del mismo parche

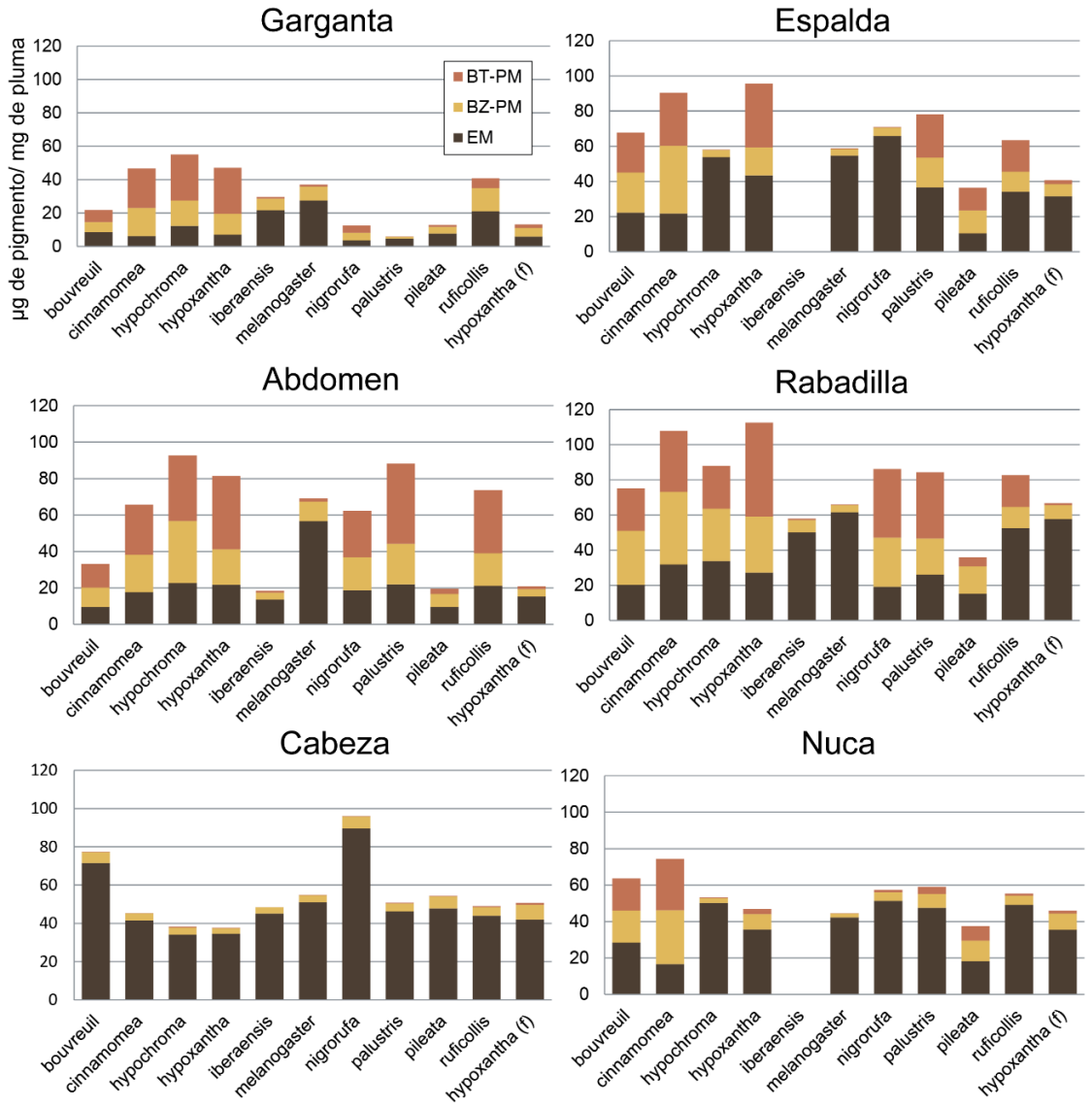
de plumaje de más de un individuo de cada especie. Por lo tanto, las medidas (64 en total) representan la concentración promedio de pigmento de cada parche de cada especie obtenida de varias plumas (en algunos casos pertenecientes a múltiples individuos).

El paso de cuantificación del contenido de melanina fue realizado en el Institute for Melanin Chemistry, Fujita Health University, en Japón (por parte de dos colaboradores del estudio, Kazumasa Wakamatsu y Shosuke Ito). Las muestras se homogeneizaron en agua con un homogeneizador Ten-Broeck (a una concentración de 10 mg/ml). Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 µl, que se sometieron a una oxidación alcalina con peróxido de hidrógeno (AHPO; Ito et al. 2011) y a una hidrólisis con ácido yodhídrico (Wakamatsu et al. 2002). La FM consta de dos moléculas, la benzotiazina (BT-FM) y el benzotiazol (BZ-FM), que se convierten en 4-amino-3-hidroxifenilalanina (4-AHP) mediante una hidrólisis con ácido yodhídrico y en tiazol-2,4, ácido 5-tricarboxílico (TTCA) mediante una AHPO, respectivamente. La EM se convierte en ácido pirrol-2, 3, 5-tricarboxílico (PTCA) a través de una AHPO (Ito et al. 2011). Luego del procesamiento y tratamiento de las muestras, se midieron las concentraciones de PTCA, 4-AHP y TTCA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). La conversión de PTCA, 4-AHP y TTCA a EM, BT-FM y BZ-FM se realizó multiplicando estos marcadores por los factores de conversión 38, 9 y 34, respectivamente (Del Bino et al. 2015) y se obtuvieron así las concentraciones de cada una de las 3 moléculas de pigmento (**Figura 3.3**).

3.2.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS)

La baja divergencia genética de los capuchinos (*Fst* promedio ~ 0.008; Campagna et al. 2017, Capítulo II) permitió realizar un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) para explorar la base genética de los diversos patrones de coloración del grupo. El método de GWAS consiste en la búsqueda de la asociación entre genotipos y una variable fenotípica mediante el ajuste de modelos lineales mixtos univariados. Se usaron las concentraciones de EM y FM como dos variables fenotípicas diferentes que juntas determinan la coloración de cada parche de plumaje. Las concentraciones utilizadas fueron las calculadas de acuerdo con el procedimiento explicado en la sección anterior y reportado en la **Figura 3.3**, usándose la concentración de EM por un lado y la de FM por otro (obtenida esta última como la suma de las concentraciones de BT y BZ).

A



B

Especie	Cabeza	Nuca	Abdomen	Espalda	Rabadilla	Garganta
S. bouvreuil	71.59; 5.64; 0.13	28.42; 17.61; 17.57	9.58; 10.64; 12.98	22.31; 22.75; 22.67	20.22; 30.67; 24.30	8.59; 6.12; 7.10
S. cinnamomea	41.50; 3.77; 0.06	16.61; 29.61; 28.20	17.67; 20.57; 27.49	21.81; 38.52; 30.02	31.88; 41.28; 34.73	6.16; 16.90; 23.63
S. hypochroma	34.12; 3.71; 0.52	50.20; 2.77; 0.30	22.69; 34.10; 35.94	53.85; 4.22; 0.08	33.74; 29.82; 24.41	12.39; 15.13; 27.53
S. hypoxantha	34.62; 2.91; 0.18	35.61; 8.53; 2.76	21.81; 19.45; 40.22	43.55; 15.74; 36.32	27.13; 32.06; 53.38	7.11; 12.58; 27.39
S. iberaensis	45.14; 3.19; 0.19	N.d.	13.64; 3.94; 0.87	N.d.	50.20; 6.94; 0.71	21.74; 7.07; 0.82
S. melanogaster	51.03; 3.71; 0.15	42.26; 2.14; 0.19	56.70; 10.71; 1.76	54.76; 3.77; 0.20	61.52; 4.05; 0.40	27.51; 8.30; 1.27
S. nigrorufa	89.53; 6.46; 0.12	51.41; 4.69; 1.32	18.73; 18.19; 25.39	65.78; 4.93; 0.15	19.19; 27.95; 39.06	3.64; 4.62; 4.26
S. palustris	46.32; 4.22; 0.24	47.65; 7.48; 3.84	22.04; 22.30; 43.80	36.56; 17.03; 24.62	26.07; 20.64; 37.66	4.67; 1.10; 0.19
S. pileata	47.80; 6.36; 0.09	18.24; 11.32; 7.89	9.65; 7.07; 2.84	10.45; 13.06; 12.96	15.16; 15.57; 5.18	7.71; 4.15; 0.95
S. ruficollis	44.04; 4.52; 0.52	49.13; 5.03; 1.26	21.17; 17.85; 34.61	34.09; 11.53; 17.86	52.48; 12.07; 18.02	21.09; 13.91; 5.82
S. hypoxantha (f)	42.03; 7.72; 1.03	35.57; 8.91; 1.56	15.35; 4.11; 1.53	31.58; 6.97; 2.13	57.76; 7.85; 1.17	5.93; 5.27; 2.04

Figura 3.3: Concentraciones de EM y FM (BT y BZ) para cada parche de plumaje de las diez especies de capuchinos. Las mismas se estimaron a partir de plumas de machos reproductores maduros y una hembra de *S. hypoxantha* para comparación. Las concentraciones de pigmentos se expresan en µg de pigmento por mg de pluma. No se determinaron las concentraciones de melanina para el dorso y la nuca de *S. iberaensis*. **(A)** Gráfico de barras que representa el contenido de EM (barras marrones), BT-FM (barras naranjas) y BZ-FM (barras amarillas). **(B)** contenido con valores numéricos de EM, BT-FM y BZ-FM (separados por punto y coma); los colores de fondo de cada celda ilustran cualitativamente el fenotipo de color en cada parche de plumaje para cada especie.

En general los capuchinos difieren en la coloración de muchos parches discretos de plumaje (ver **Figura 3.3** con los parches y **Figura 1.4** (Capítulo I) que muestra la variación de patrones de coloración dentro del grupo), pero como ya se ha explicado *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* difieren solo en la coloración de la garganta (canela, blanco y negro, respectivamente, ver **Figura 2.8** del Capítulo II). Se analizaron por lo tanto primero estas tres especies para asociar las diferencias en sus genotipos con los fenotipos del color de la garganta y ver qué regiones (y qué genes) están involucradas en su determinación. Las especies se compararon primero de a pares y luego se analizaron las tres especies juntas. En los análisis solo se incluyeron datos genómicos de machos maduros de las tres especies (20 *S. hypoxantha*, 12 *S. palustris* y 15 *S. ruficollis*).

Para los análisis se utilizó el programa GEMMA v.0.98 (Zhou & Stephens, 2014). En primer lugar, se submuestreó el archivo VCF completo con los 127 individuos (data set completo, ver Capítulo II) usando el programa VCF tools para incluir solo aquellos individuos y variantes relevantes para el GWAS específico (en todos los casos, se excluyeron los grupos externos y un individuo atípico de *S. hypochroma*; Campagna et al. 2017). En cada sub- VCF generado se imputaron los datos faltantes con el programa BEAGLE v.4.1 (Browning & Browning, 2007) ya que los análisis en GEMMA requieren conjuntos de datos completos. Luego se transformaron los conjuntos de datos al formato BED con el programa PLINK v.1.09 (Purcell et al., 2007). En cada GWAS se corrigieron los bajos niveles de estructura poblacional mediante la incorporación al modelo de una matriz de correlación interindividual e identificando la asociación entre los SNPs y los parches de plumaje con una prueba de Wald. La significancia estadística de cada asociación se determinó aplicando correcciones de Bonferroni (α= 0,05/número de SNP x número de GWAS) para cada GWAS. En total se realizaron 20 GWAS y se incluyeron aproximadamente 29,8 millones de SNPs (en los análisis que incluyeron todas las especies). A este número de comparaciones le correspondió un nivel de significancia de -log(p) = 10 y, por lo tanto, se adoptó este valor como un umbral conservativo común en todos los GWAS, incluidos los del parche de la garganta aun cuando involucraron solo a un par de especies y un menor número de SNPs.

Los resultados se muestran en gráficos Manhattan como valores *P* transformados logarítmicamente (-log(*p*)) usando el paquete qqman (Turner, 2014) en R versión 4.0.3 (R Core Team, 2020). Las regiones de asociación significativa (o picos de asociación) se definieron como las áreas genómicas que contienen por lo menos 5 SNPs significativamente asociados (utilizando el umbral mencionado anteriormente), que estén distanciados en menos de 100 kb. Así mismo, se definió la ubicación de esta región como la porción de ADN abarcada entre los SNPs más

cercanos a los extremos 5' y 3' dentro del grupo. Esta estrategia se siguió para centrar el estudio en las regiones con las asociaciones más fuertes, excluyendo regiones con SNPs únicos o con pocos SNPs asociados significativamente (lo que solo ocurrió en una pequeña cantidad de las comparaciones). Finalmente, como se hizo en el capítulo II se examinaron las anotaciones de genes en las regiones asociadas con Geneious v.9.1.5 (Kearse et al., 2012) usando el genoma de referencia de *S. hypoxantha* generado por Campagna et al. (2017) para compilar los genes dentro de las ±50 kb de cada región. Las funciones de los genes se buscaron manualmente en GeneCards (https://www.genecards.org).

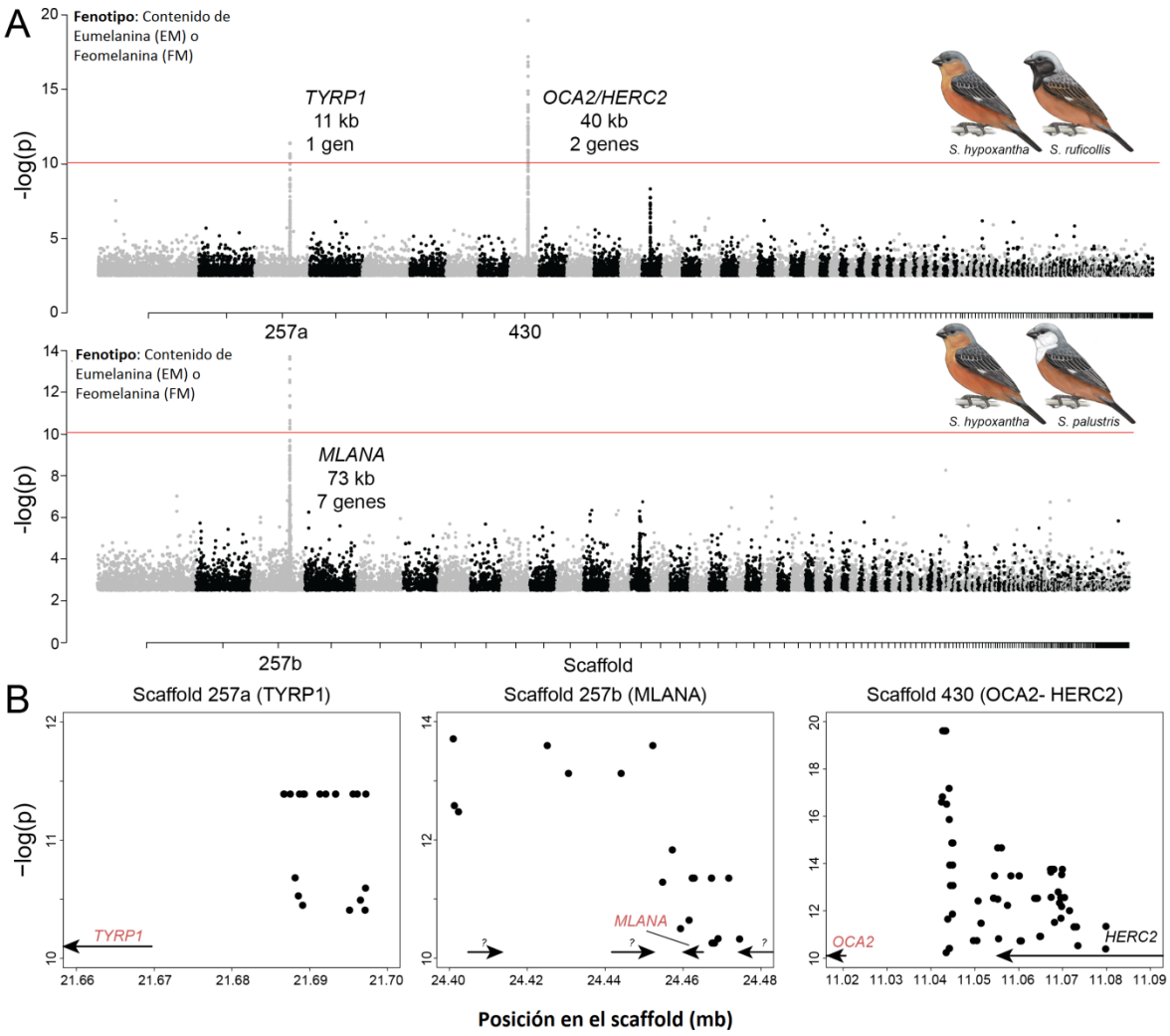
3.3. RESULTADOS

3.3.1. LAS REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON LA COLORACIÓN DE LA GARGANTA VARÍAN SEGÚN EL COLOR DE LOS PARCHES DE PLUMAJE QUE SE COMPARAN

Se realizaron comparaciones de a pares de las tres especies que difieren únicamente en la coloración de la garganta, y se encontró que los genes involucrados con las diferencias entre gargantas canelas y negras (*S. hypoxantha* vs. *S. ruficollis*) son independientes de los involucrados con las diferencias entre gargantas canelas y blancas (*S. hypoxantha* vs. *S. palustris*; **Figura 3.4**). El GWAS realizado con *S. hypoxantha* (garganta canela) y *S. ruficollis* (garganta negra; basado en 8.222.918 SNPs de 35 individuos) reveló dos picos compuestos por un total de 90 SNPs asociados estadísticamente con la concentración de EM y FM en la garganta, uno en el *scaffold* 257 (*pico a*, en el cromosoma Z; **Figura 3.4.a**) y uno en el *scaffold* 430 (cromosoma 1; **Figura 3.4.a**, **Tabla 3.1**). Dentro de los picos, se encontraron solo tres genes, todos involucrados en la melanogénesis: *TYRP1*, *OCA2* y *HERC2* (**Figura 3.4.b**, **Tabla 3.1**). Mientras que *OCA2* y *TYRP1* participan directamente en la melanogénesis y controlan el color de la piel, los ojos, el plumaje y el pelo en otros taxones (Kenny et al. 2012, Sturm & Frudakis 2004), *HERC2* contiene elementos reguladores que modulan la expresión de *OCA2* (Visser et al. 2012). El GWAS basado en el conjunto de datos de *S. hypoxantha* (garganta canela) y *S. palustris* (garganta blanca; basado en 8.196.309 SNPs de 32 individuos) mostró un solo pico estadísticamente significativo en el *scaffold* 257 (*pico b*, ubicado en una región diferente que el *pico a* de la comparación de *S. hypoxantha* vs. *S. ruficollis*), compuesta por 23 SNPs asociados con el contenido de EM y FM de la garganta (**Figura 3.4.a**, **Tabla 3.1**). Este pico contiene a *MLANA*, un gen de melanogénesis que juega un papel crucial en la biogénesis de los melanosomas (Hoashi et al. 2005) y seis genes adicionales dentro de las +/-50 kb del pico, cuatro de los cuales tienen funciones desconocidas (**Figura 3.4.b**, **Tabla 3.1**). Finalmente, el GWAS en el que se analizaron las diferencias genómicas de *S. ruficollis* (garganta negra) y *S. palustris* (garganta blanca; basado en 8.133.187 SNPs de 27 individuos) en relación al contenido de EM y FM de la garganta mostró los tres picos detectados

en las comparaciones anteriores, pero también un pico en el *scaffold* 404 (cromosoma Z) que contenía al gen de melanogénesis *SLC45A2*, relacionado con la coloración en aves y mamíferos (**Figura 3.5**; Gunnarsson et al. 2007, Stokowski et al. 2007). Por lo tanto, las diferencias en el color de la garganta entre canela (*S. hypoxantha*) y blanco o negro (*S. palustris* y *S. ruficollis*, respectivamente) no solamente se asocian a genes diferentes, sino que además muestran menos asociaciones genéticas que las diferencias entre el fenotipo blanco y negro.

El análisis que consideró a las tres especies de capuchinos focales juntas (basado en 8.245.318 SNPs, 47 individuos) confirmó los resultados obtenidos a través de las comparaciones de a pares de especies y detectó los mismos 4 picos que se detectaron en el análisis de GWAS basado en el contenido de EM (**Figura 3.6**, **Tabla 3.1**). Sin embargo, el análisis de GWAS basado en el contenido de FM de la garganta no mostró picos de asociación estadísticamente significativos (**Tabla 3.1**). En total, dentro de los cuatro picos, se encontraron 10 genes con función conocida (y también cuatro genes predichos con función desconocida), cuatro de los cuales (*TYRP1*, *MLANA*, *SLC45A2* y *OCA2*) están directamente involucrados en la melanogénesis (**Tabla 3.1**, **3.2**; **Figuras 3.4**, **3.5** y **3.6**).



<u>Figura 3.4:</u> Base genética del contenido de EM y FM de la garganta basado en comparaciones de a pares realizadas entre *S. hypoxantha* (garganta canela) y *S. ruficollis* (garganta negra), y *S. hypoxantha* y *S. palustris* (garganta blanca). (A) Gráficos Manhattan que ilustran los resultados de los análisis de GWAS entre el contenido de EM y FM de las plumas de la garganta y los genotipos de aproximadamente 8,2 millones de SNPs. Los SNPs con valores de asociación por debajo de −log (*p*) de 2,5 se eliminaron para que el gráfico tenga mayor claridad. Las líneas rojas indican el umbral estadístico de significancia de las asociaciones. Junto a cada pico se muestra: el número total de genes, los nombres de los genes relacionados con la melanogénesis dentro de esa región y el tamaño del pico (en kb). Se obtuvieron los mismos resultados para GWAS realizados en base al contenido de EM y de FM, se muestran por lo tanto solo los basados en el contenido de EM como ejemplo. **(B)** Imágenes ampliadas de los picos que se muestran en (A) en donde los puntos negros representan SNPs estadísticamente significativos y las flechas representan genes (los involucrados en la melanogénesis tienen sus nombres resaltados en color rojo).

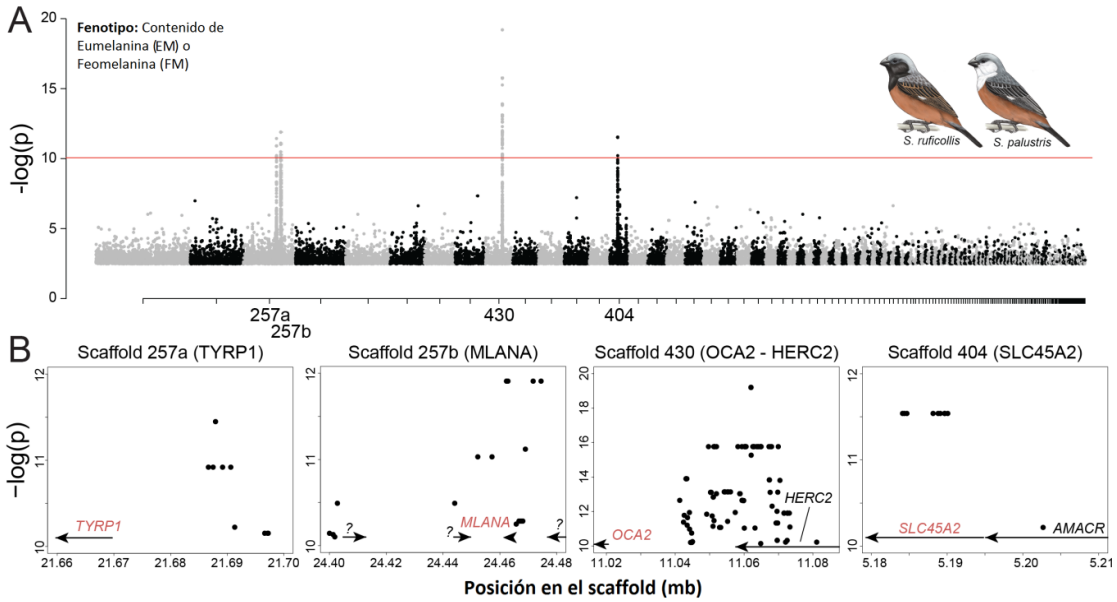


Figura 3.5: Base genética del contenido de EM y FM en la garganta obtenida de la comparación de *S. ruficollis* (garganta negra) y *S. palustris* (garganta blanca). (A) Gráficos Manhattan que muestran los resultados de los análisis GWAS entre el contenido de EM y FM de las plumas de la garganta y los genotipos de aproximadamente 8,2 millones de SNPs. **(B)** Imágenes ampliadas de los picos significativamente asociados con las concentraciones de EM y FM en la garganta (los resultados basados en la concentración de EM se muestran como ejemplo). Otros detalles como en la **Figura 3.4**.

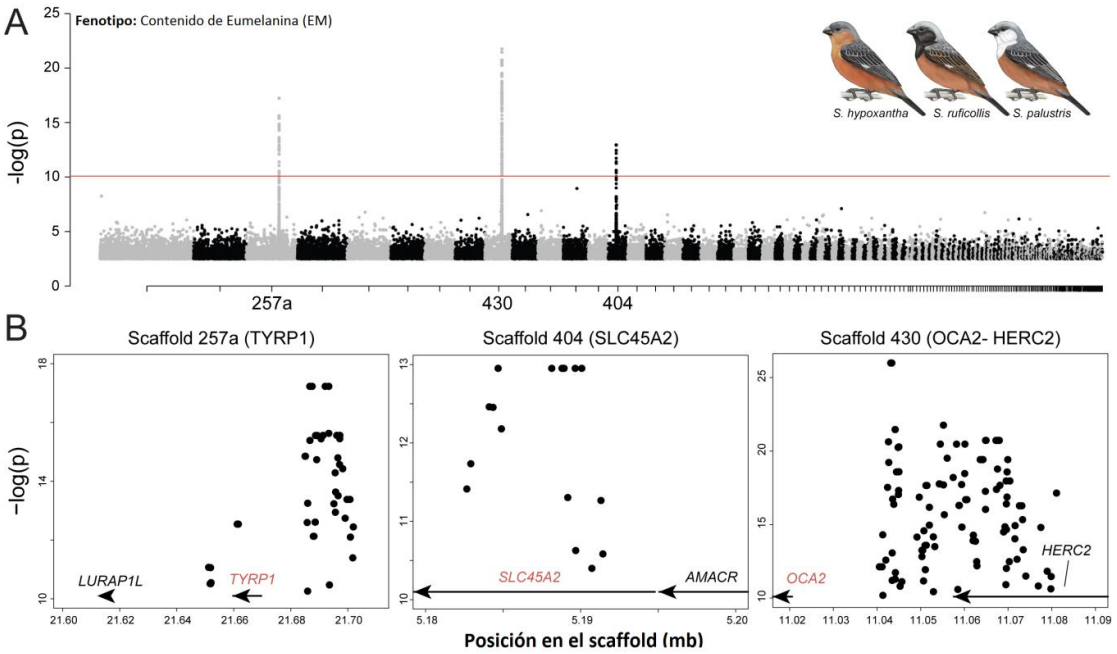


Figura 3.6: Base genética del contenido de EM en la garganta obtenida de la comparación de *S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris*. (A) Gráficos Manhattan que muestran los resultados de los análisis GWAS entre el contenido de EM de las plumas de la garganta y los genotipos de aproximadamente 8,2 millones de SNPs. **(B)** Imágenes ampliadas de los picos significativamente asociados con las concentraciones de EM en la garganta. Otros detalles como en la **Figura 3.4**.

<u>Tabla 3.1</u>: Regiones genómicas que se asociaron significativamente con la variación en la concentración EM y/o FM de la garganta. Se reportan los resultados de los análisis de GWAS basados en las comparaciones de *S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris* (de a pares y todas juntas). Los picos se nombran según los *scaffolds* en los que se detectaron. Se enumeran todos los genes dentro de ± 50 kb del pico, y los genes que participan directamente en la melanogénesis están resaltados en negrita. El número de genes con funciones desconocidas contenidos dentro de los picos se indican entre paréntesis.

Pico*	Cromosoma	Tamaño del pico (kb)	N° de SNPs significativos	Genes de pigmentación	Comienzo	Fin	Genes
S. hypoxantha* vs *S. ruficollis							
257(a)	Z	10.56	20	***TYRP1***	21686672	21697228	***TYRP1***
430	1	37.45	70	***OCA2***, *HERC2*	11042416	11079861	***OCA2***, *HERC2*
S. hypoxantha* vs *S. palustris							
257(b)	Z	73.49	23	***MLANA***	24401002	24474489	*Desc.* (4), ***MLANA***, *ERMP1*, *KIAA1432*
S. ruficollis* vs *S. palustris							
257(a)	Z	10.56	9	***TYRP1***	21686672	21697228	*TYRP1*
257(b)	Z	74.48	22	***MLANA***	24400014	24474489	*Desc.* (4), ***MLANA***, *ERMP1*, *KIAA1432*
404	Z	18.56	10	***SLC45A2***	5184107	5202663	*RXFP3*, *SLC45A2*, *AMACR*, *C1QTNF3*
430	1	39.78	93	***OCA2***, *HERC2*	11041309	11081093	***OCA2***, *HERC2*
S. hypoxantha, S. ruficollis* y *S. palustris (solo hay asociaciones significativas para el contenido de EM)							
257(a)	Z	50.77	50	***TYRP1***	21651183	21701950	*LURAP1L*, ***TYRP1***
404	Z	8.77	16	***SLC45A2***	5182665	5191438	*RXFP3*, *SLC45A2*, *AMACR*, *C1QTNF3*
430	1	40.55	120	***OCA2***, *HERC2*	11040540	11081093	***OCA2***, *HERC2*

Tabla 3.2: Genes relacionados con la pigmentación dentro de los picos de asociación.

Gen	Función	*Scaffold*	Cromosoma	Referencia en otros sistemas animales
OCA2	Transporta la tirosina, un precursor de la melanina, durante la melanogénesis.	430	1	Gross & Wilkens 2013, Zhang et al. 2015, Abolins-Abols et al. 2018.
HERC2	Contiene un regulador de *OCA2*.	430	1	Kayser et al. 2008, Visser et al. 2012.
TYRP1	Enzima que interviene en la melanogénesis.	257a	Z	Domyan et al. 2014, Li et al. 2019, Xu et al. 2019.
SLC45A2	Transporta sustancias usadas durante la melanogénesis.	404	Z	Gunnarsson et al. 2007, Domyan et al. 2014.
MLANA	Interviene en la formación de los melanosomas.	257b	Z	Abolins-Abols et al. 2018, Bruders et al. 2020.
ASIP	Estimula la síntesis de FM en vez de la EM.	252	20	Oribe et al. 2012, Toews et al. 2016, Uy et al. 2016.
KITL	Tiene un rol fundamental durante la proliferación de melanocitos.	412	1	Okumura et al. 2008, Stryjewski et al. 2017.
GPR161	Relacionado con hiperpigmentación progresiva familiar con o sin hipopigmentación en humanos.	3622	1	Li et al. 2017, Baxter et al. 2019.
TBX19	Relacionado con la hipopigmentación en ratones.	3622	1	Pulichino et al. 2003, Baxter et al. 2019.
DIO2	Asociado con retraso en el desarrollo de la pigmentación en el pez cebra.	1954	5	Walpita et al. 2009, Baxter et al. 2019.
AHCY	Relacionado con la calidad de melanocitos en el pez cebra y con el pelaje blanco en ovejas.	252	20	Norris & Whan 2008, Baxter et al. 2019.

3.3.2. LA VARIACIÓN DE COLOR EN LA MAYORÍA DE LOS PARCHES DE PLUMAJE IMPLICA UNA COMBINACIÓN ÚNICA DE PICOS DE ASOCIACIÓN Y DEPENDE DEL TIPO DE PIGMENTO

Se buscaron las regiones genómicas que se asocian con la variación en el fenotipo de color de los seis principales parches de plumaje que varían en las diez especies de capuchinos del sur. Para ello, se realizaron análisis de asociación entre los genotipos de aproximadamente 29,8 millones de SNPs (pertenecientes a 122 individuos) y el contenido de EM y FM en las plumas de cada parche de plumaje (ver **Figura 3.3.b**). En general, se encontraron asociaciones más fuertes cuando los análisis se realizaron en base a las concentraciones de EM como fenotipo (**Figura 3.7**), que cuando se usaron concentraciones de FM (**Figura 3.8**). Todos los parches de plumaje mostraron picos de divergencia en el GWAS basado en el contenido de EM, que comprenden desde un pico para la espalda (incluidos 35 SNPs) hasta 12 picos para la cabeza (625 SNPs dentro

de los picos; **Figura 3.7** y **Tabla 3.3**). Sin embargo, en el GWAS basado en el contenido de FM, ni la garganta ni la espalda mostraron picos de divergencia asociados con la variación en el color (**Figura 3.8** y **Tabla 3.4**). El resto de los parches de plumaje tuvieron asociaciones con el contenido de FM, que comprendieron desde dos picos para la rabadilla (158 SNPs dentro de los picos) hasta 12 picos para la nuca (96 SNPs dentro de los picos, aunque los picos en esta comparación no estuvieron tan bien definidos como en el resto de las comparaciones; **Figura 3.8** y **Tabla 3.4**). Los picos de asociación tuvieron un tamaño promedio de 76,82 kb ± 104,83 SD en el caso de EM (**Tabla 3.3**) y de 20,47 kb ± 27,70 SD para FM (**Tabla 3.4**).

Cada parche mostró una combinación única de picos de asociación significativa con la concentración de EM y FM de sus plumas (**Figuras 3.7** y **3.8**, **Tablas 3.3** y **3.4**). La única excepción fueron los parches de la garganta y la rabadilla, que para el contenido de EM mostraron los mismos cuatro picos de asociación (coincidiendo en 107 de 172 SNPs). La mayoría de los picos que contuvieron genes de pigmentación se asociaron únicamente con el contenido de EM en los diferentes parches. Si bien algunos se compartieron entre las comparaciones de EM y FM, en estos casos hubo poca superposición de los SNPs específicos asociados con cada pigmento dentro de cada pico (**Tabla 3.4**). Finalmente, hubo un solo pico que se asoció con la concentración de FM y no de EM.

En total entre los 12 análisis GWAS realizados, se identificaron 59 genes con funciones conocidas dentro de los picos asociados con la variación en el contenido de EM y FM (y, además, 30 genes predichos con funciones desconocidas). Nueve de estos genes conocidos están relacionados con la coloración melánica. En la mayoría de los casos, los genes de pigmentación se encontraron en los picos con valores de asociación más fuertes dentro de cada parche de plumaje. La mayoría de los picos que muestran asociaciones con la variación del contenido de EM y FM se han descrito previamente como regiones de *Fst* elevado en comparaciones de a pares de especies de capuchinos (Campagna et al. 2017; Turbek et al. 2021, capítulo II). Esto indica que las regiones genómicas que regulan la coloración del plumaje son un subconjunto de las regiones más diferenciadas del grupo. Los picos del *scaffold* 3622 (cromosoma 1) y el *scaffold* 1954 (cromosoma 5) asociados con el contenido de eumelanina de la cabeza (161 y 54 SNPs, respectivamente; **Figura 3.7**, **Tabla 3.3**) contienen a los genes *GPR161*, *TBX19* (*scaffold* 3622) y *DIO2* (*scaffold* 1954), que junto con *AHCY* en el *scaffold* 252 han sido vinculados con la pigmentación en sistemas modelo (Baxter et al. 2019), pero no habían sido implicados previamente en la variación de color en capuchinos a pesar de estar en zonas de alta divergencia genómica (Campagna et al. 2017).

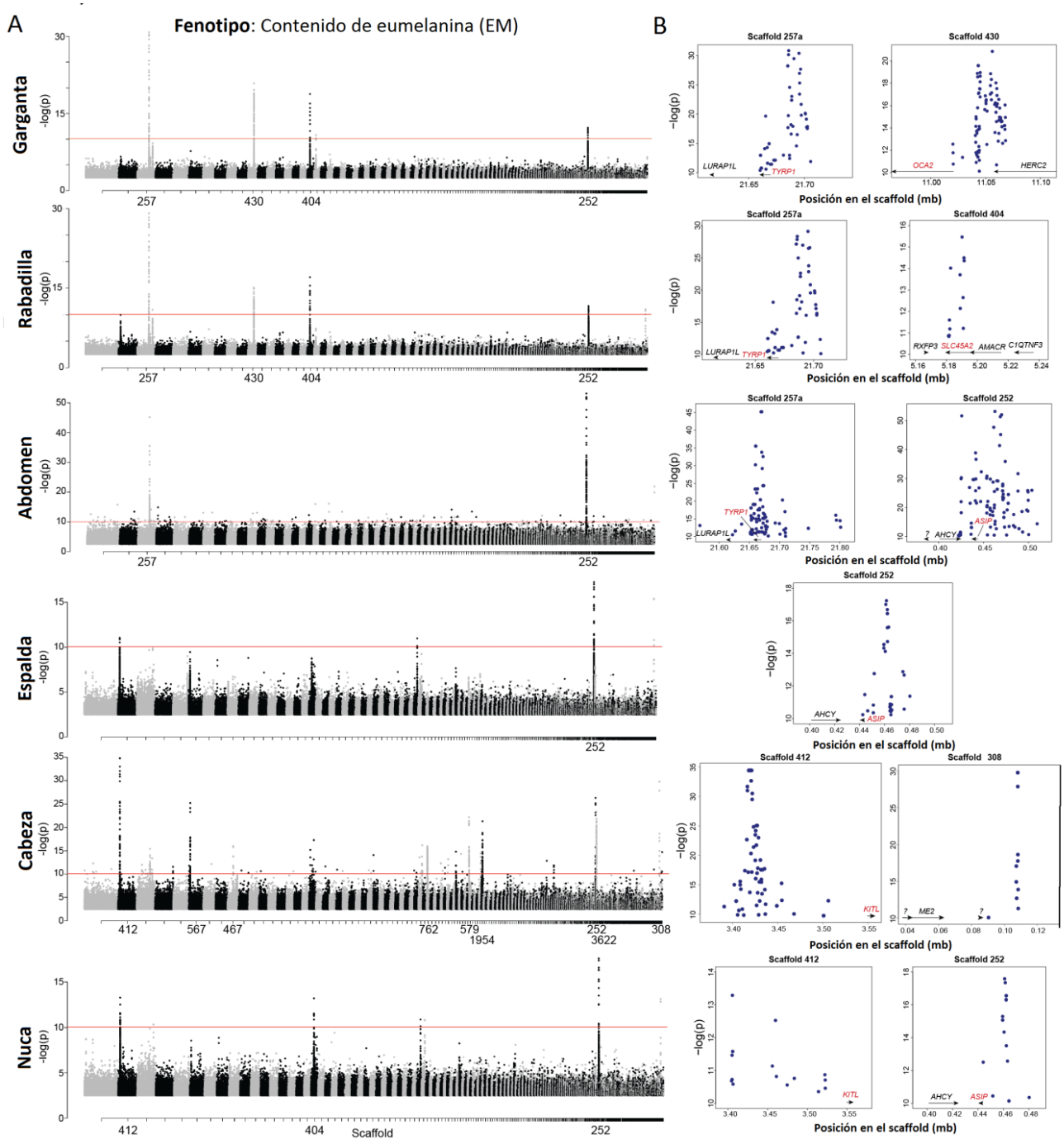


Figura 3.7: Análisis de GWA basados en la concentración de EM para cada parche de plumaje realizado con las 10 especies de capuchinos del sur. **(A)** Gráficos Manhattan que presentan los resultados de los GWAS para cada parche de plumaje hechos utilizando valores de contenido de EM y los genotipos de aproximadamente 29,8 millones de SNPs de las 10 especies comparadas. Los picos de asociación se nombran de acuerdo con su *sacaffold*. **(B)** Imágenes ampliadas de los dos picos con valores de asociación más fuertes para cada parche de plumaje (la espalda muestra un solo pico de acuerdo con los criterios descriptos en la metodología). Otros detalles como en la **Figura 3.4**.

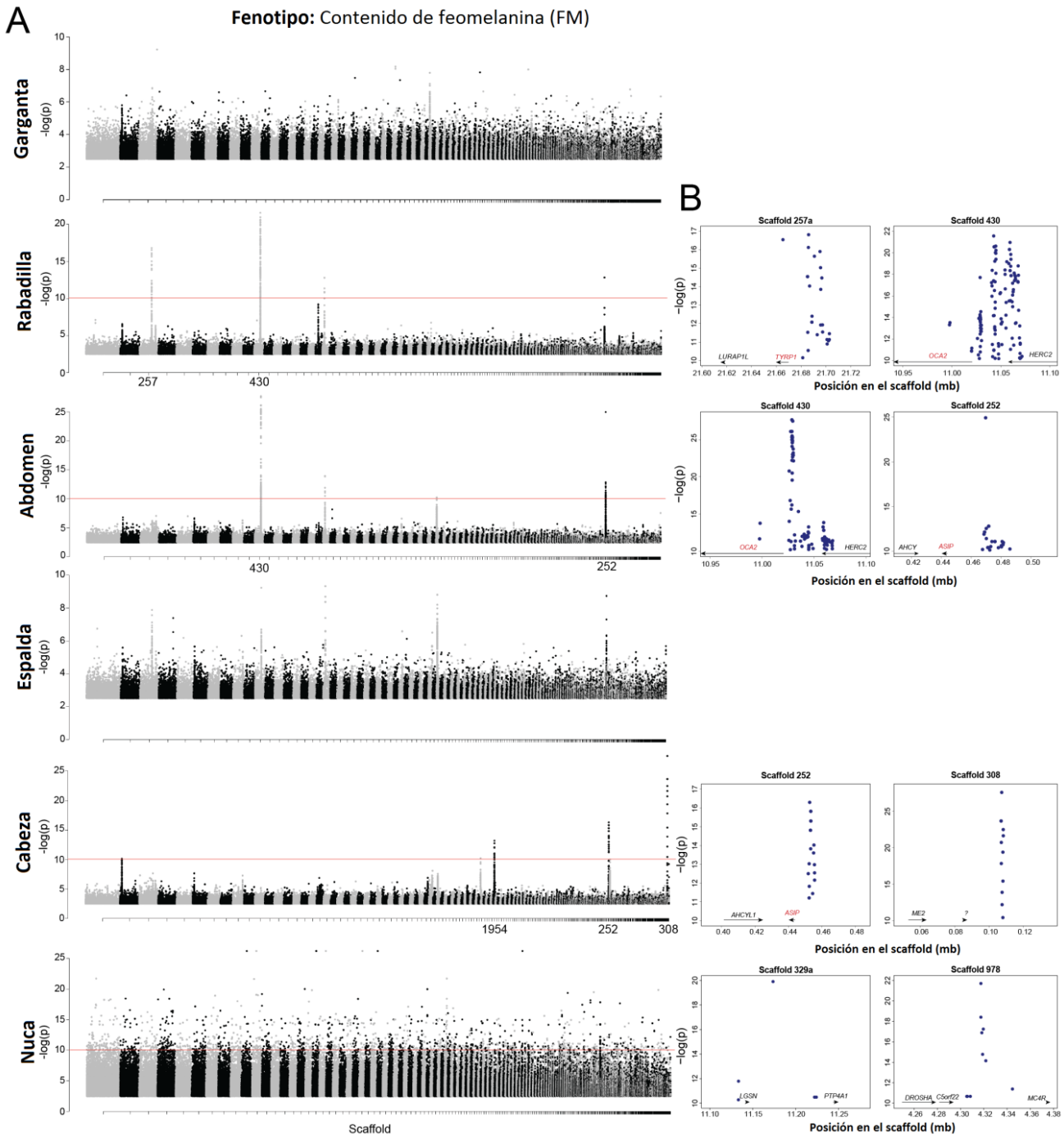


Figura 3.8: Análisis de GWA basados en la concentración de FM para cada parche de plumaje realizado con las 10 especies de capuchinos del sur. **(A)** Gráficos Manhattan de los GWAS para cada parche de plumaje utilizando valores de contenido de FM y los genotipos de aproximadamente 29,8 millones de SNPs de las 10 especies comparadas juntas. Los picos de asociación se nombraron de acuerdo con al *sacaffold* en el que se encontraron. **(B)** Imágenes ampliadas de los dos picos con valores de asociación más fuertes para cada parche de plumaje (la garganta y la espalda no muestran picos de asociación significativa de acuerdo con los criterios descriptos en la metodología). Otros detalles como en la **Figura 3.4**.

Tabla 3.3: Regiones genómicas asociadas significativamente con los cambios en el contenido de EM de los seis parches de plumaje cuando se compararon las 10 especies de capuchinos del sur juntas en un GWAS. Los picos se nombran según los *scaffolds* en los que se encontraron. Otros detalles como en la **Tabla 3.1**.

EUMELANINA							
Parche de plumaje	**Pico**	**Tamaño del pico (kb)**	**N° de SNPs significativos**	**Genes de coloración**	**Comienzo**	**Fin**	**Genes**
Espalda	252	37.72	35	***ASIP***, *AHCY*	442512	480233	***ASIP***, *AHCY*
Abdomen	252	87.58	101	***ASIP***, *AHCY*	422050	509630	***ASIP***, *AHCY, unknown*
	257(c)	34.73	14	-	21435037	21469762	*MPDZ*
	257(a)	179	104	***TYRP1***	21622273	21801272	***TYRP1***, *LURAP1L*
Cabeza	252	33.78	19	***ASIP***, *AHCY*	452085	485861	***ASIP***, *AHCY*
	257(b)	32.72	29	***MLANA***	24437851	24470570	*unknown* (4), ***MLANA***, *ERMP1*
	263	119.03	10	-	32353	151384	*unknown* (4), *CCDC11*
	308	18	11	-	90344	108347	*unknown* (2), *ME2*
	412	115.39	66	***KITLG***	3390728	3506113	***KITLG***
	467	25.41	12	-	10290068	10315473	-
	567(a)	48.36	14	-	2517403	2565760	*ITGA9, GOLGA4*
	567(b)	56.76	32	-	2701775	2758539	*unknown* (4),
	579(a)	196.71	57	-	43306	240017	*unknown* (5), *RWDD2B, CD200, C3orf52, TMPRSS7*
	579(b)	124.50	13	-	303436	427937	*unknown* (2), *TMPRSS7, TAGLN3, ABHD10*
	637	3.59	8	-	6466013	6469604	-
	1790	2.90	6	-	3761418	3764320	*RCSD1, MPZL1, MPC2, DCAF6*
	762	23.41	109	-	1666833	1690246	*C16orf87, GPT2, unknown, DNAJA1, NETO2*
	1875	205.77	24	-	1834754	2040524	*FAM84A*
	1954	39.51	54	*DIO2*	2840008	2879522	*DIO3,DIO2*
	3622	555.02	161	*TBX19, GPR161*	806830	1361846	*TBX19, SFT2D2, TIPRL,*

							GPR161, TTF2,CPOX,ST 3GAL6, COL8A1, DCBLD2, unknown (2)
Nuca	252	36.10	18	***ASIP**, AHCY*	444136	480233	***ASIP**, AHCY*
	404	5	7	***SLC45A2***	5185863	5190864	*RXFP3,* ***SLC45A2****, AMACR, C1QTNF3*
	412	118.01	16	***KITLG***	3404478	3522491	***KITLG***
Rabadilla	252	48.45	9	***ASIP**, AHCY*	425652	474102	*unknown,* ***ASIP****, AHCY*
	257(a)	45.85	59	***TYRP1***	21660285	21706136	***TYRP1****, LURAP1L*
	404	10.18	12	***SLC45A2***	5181258	5191438	*RXFP3,* ***SLC45A2****, AMACR, C1QTNF3*
	430	26.38	34	***OCA2**, HERC2*	11041309	11067689	***OCA2****, HERC2*
Garganta	252	48.45	9	***ASIP**, AHCY*	425652	474102	*unknown,* ***ASIP****, AHCY*
	257(a)	45.33	56	***TYRP1***	21660285	21705612	***TYRP1****, LURAP1L*
	404	9.55	10	***SLC45A2***	5181889	5191438	*RXFP3,* ***SLC45A2****, AMACR, C1QTNF3*
	430	48.09	87	***OCA2**, HERC2*	11020045	11068136	***OCA2****, HERC2*

Tabla 3.4: Regiones genómicas asociadas significativamente con los cambios en el contenido de FM de los seis parches de plumaje cuando las 10 especies de capuchinos del sur se compararon juntas en un GWAS. Otros detalles como en la **Tabla 3.2**.

FEOMELANINA							
Parche de plumaje	**Pico**	**Tamaño del pico (kb)**	**N° de SNPs significativos**	**Genes de coloración**	**Comienzo**	**Fin**	**Genes**
Espalda	-	-	-	-	-	-	-
Abdomen	252	18.29	25	***ASIP**, AHCY*	467576	485862	***ASIP**, AHCY*
	430(a)	70.39	92	***OCA2**, HERC2*	10997602	11067987	***OCA2**, HERC2*
	1635	2.56	6	-	3723260	3725818	*ZNF503*
Cabeza	252	3.79	18	***ASIP**, AHCY*	451886	455674	***ASIP**, AHCY*
	308	1.27	12	-	107076	108347	*ME2,unknown*
	1954	4.46	11	*DIO2*	2872503	2876959	*DIO3,DIO2*
Nuca	78	0.91	7	-	4919338	4920249	*MAOB, unknown*
	118	7.72	5	-	23508624	23516339	-
	219	2.75	5	-	470734	473481	*TMEM167A, unknown*

	252	55.61	20	***ASIP**, AHCY*	429229	484837	*unknown, AHCY,**ASIP***
	257(d)	0.88	5	-	15178711	15179586	-
	329(a)	88.62	5	-	11133332	11221954	*LGSN,PTP4A1*
	329(b)	0.11	5	-	27339132	27339237	-
	424	11.82	6	-	10360311	10372129	*GORASP2,TLK1*
	430(b)	2.02	5	-	7578585	7580608	*TMEM182, MFSD9,SLC9A2,unknown*
	467	4.15	8	-	17939266	17943416	-
	791	1.66	5	-	3778574	3780235	-
	967	2.8	5	-	4455639	4458439	-
	978	39.30	10	-	4305318	4344621	*DROSHA, C5orf22,MC4R*
	1123	19.77	5	-	764802	784574	*PDS5B,UBE2K*
Rabadilla	257(a)	37.46	26	***TYRP1***	21665245	21702705	***TYRP1**, LURAP1L*
	430(a)	73.96	132	***OCA2**, HERC2*	10997602	11071560	***OCA2**, HERC2*
Garganta	-	-	-	-	-	-	-

Tabla3.5: Regiones genómicas que contienen genes de pigmentación asociados con la concentración de EM, PM o ambos pigmentos en los seis parches de plumaje para las diez especies de capuchinos del sur. Se indican el número de SNPs compartidos por las asociaciones a la concentración de EM y de FM. Otros detalles como en la **Tabla 3.1**.

Parche de plumaje	Picos asociados únicamente con el contenido de EM	Picos asociados con el contenido de EM y FM	Picos asociados únicamente con el contenido de FM
Espalda	252 (*ASIP, AHCY*)	-	-
Abdomen	257a (*TYRP1*)	252 (*ASIP, AHCY*) 0 SNPs compartidos	430 (*OCA2- HERC2*)
Cabeza	257b (*MLANA*), 412 (*KITL*), 3622 (*TBX19, GPR161*)	252 (*ASIP, AHCY*) 2 de 35 SNPs compartidos 1954 (*DIO2*) 11 of 54 compartidos	-
Nuca	404 (*SLC45A2*), 412 (*KITL*)	252 (*ASIP, AHCY*) 14 de 24 SNPs compartidos	-
Rabadilla	252 (*ASIP, AHCY*), 404 (*SLC45A2*)	257 (*TYRP1*) 26 de 59 SNPs compartidos 430 (*OCA2-HERC2*) 31 de 135 SNPs compartidos	-
Garganta	252 (*ASIP, AHCY*), 404 (*SLC45A2*), 257a (*TYRP1*), 430 (*OCA2- HERC2*)	-	-

3.3.3. LOS INDIVIDUOS CON GARGANTAS NEGRAS COMPARTEN GENOTIPOS EN LAS REGIONES GENÓMICAS QUE ESTÁN ASOCIADAS CON LA COLORACIÓN DE LA GARGANTA

Se exploraron genotipos individuales en los picos de asociación vinculados a cambios en la concentración de EM y FM en la garganta para buscar cambios comunes entre especies con colores de garganta similares. Primero se estudiaron en las tres especies focales involucradas en la comparación de la garganta (*S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris*). En los *scaffolds* 257 (*pico a*, *TYRP1*), 404 (*SLC45A2*) y 430 (*HERC2-OCA2*), los individuos de *S. hypoxantha* (garganta canela) y *S. palustris* (garganta blanca) tendieron a compartir el mismo genotipo, mientras que los individuos de *S. ruficollis* (garganta negra) tuvieron el genotipo opuesto (**Figura 3.9**). Cuando este análisis se extendió al GWAS basado en las diez especies de capuchinos, se encontró que para el *scaffold* 257 (*pico a*, *TYRP1*) los capuchinos con garganta negra (*S. ruficollis*, *S. iberaensis* y *S. melanogaster*) tendían a compartir los mismos genotipos, difiriendo del genotipo más comúnmente observado en el resto de los capuchinos sin garganta negra (**Figura 3.10**). El patrón también se observó, aunque menos pronunciadamente (con muchos individuos heterocigotas), en el *scaffold* 430 (*OCA2*) y el *scaffold* 404 (*SCL45A2*; **Figura 3.10**). En general, este resultado sugiere que los mismos cambios genómicos en *TYRP1* (y quizás también en otros genes como *OCA2*) podrían controlar la coloración negra de la garganta en diferentes especies. El GWAS para la garganta basado en todas las especies de capuchinos del sur también mostró un pico de divergencia asociado con el contenido de EM en el *scaffold* 252 (*ASIP*). En este pico, *S. melanogaster* (garganta negra) fue la única especie que tuvo genotipos que diferían del resto de los genotipos observados en los otros capuchinos (incluyendo *S. ruficollis* y *S. iberaensis*, que también poseen garganta negra; **Figura 3.10**).

Se observó una situación similar a la anterior en el *scaffold* 257 (*pico b*, *MLANA*), pero en este caso diferenciándose la especie que presenta el color blanco: los individuos de *S. hypoxantha* (garganta canela) y *S. ruficollis* (garganta negra) tendieron a compartir los mismos genotipos, mientras que los individuos de *S. palustris* (garganta blanca) presentaron genotipos opuestos (**Figura 3.9**). Este patrón también se notó al extender el análisis a las diez especies del clado (**Figura 3.10**). Finalmente, la mayoría de los individuos fueron homocigotas en los sitios seleccionados, con una minoría de heterocigotas (**Figuras 3.9** y **3.10**).

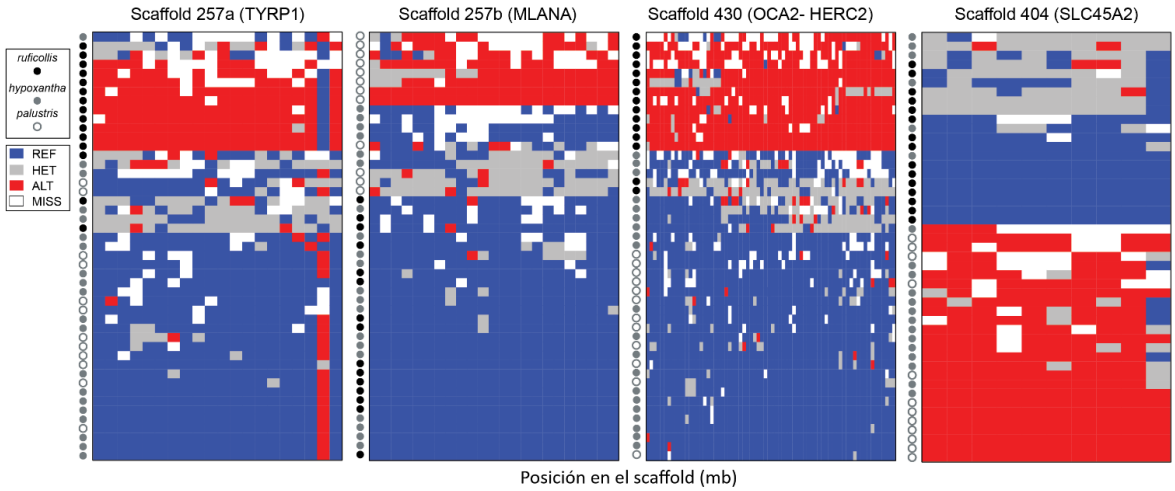


Figura 3.9: Genotipos de 20 *S. hypoxantha* (identificados con puntos grises a la izquierda de cada gráfico), 12 *S. palustris* (puntos blancos) y 15 *S. ruficollis* (puntos negros) para los SNPs que definen los picos de divergencia que se asociaron significativamente con las concentraciones de EM y FM de la garganta. Los genes de la melanogénesis se muestran junto al nombre de los *scaffolds*. Cada fila representa un individuo y los SNPs focales se muestran en las diferentes columnas. Los recuadros azules y rojos indican genotipos homocigotas (*REF* y *ALT*; alelos de referencia y alternativos respectivamente), los recuadros grises representan genotipos heterocigotas (*HET*) y los recuadros blancos (*MISS*) indican datos faltantes.

3.3.4. LA MAYORÍA DE LOS CAMBIOS OCURREN EN REGIONES NO CODIFICANTES Y DIFERENTES ÁREAS DENTRO DE LAS MISMAS REGIONES CANDIDATAS CONTROLAN DIFERENTES PARCHES DE PLUMAJE

Entre los 20 GWAS realizados en este estudio, se encontraron en total 682 posiciones involucradas en al menos una asociación estadística significativa dentro de los cinco picos principales que contienen genes de coloración (en los picos de los *scaffolds* 252, 257a, 404, 412 y 430). La gran mayoría de estas posiciones se ubicaron en regiones intergénicas o dentro de intrones, como ya había sido reportado para las posiciones con *Fst*s elevados (Campagna et al. 2017, Turbek et al. 2021, Capítulo II). Sin embargo, nueve de estas posiciones ocurrieron en regiones exónicas y, por lo tanto, es probable que influyan en secuencias codificantes. Cuatro posiciones estuvieron sobre exones de *TYRP1* e involucraron cambios en la mayoría de los individuos de *S. melanogaster*, tres ocurrieron sobre exones de *SLC45A2* e involucraron cambios en la mayoría de los individuos de *S. ruficollis* y algunos *S. hypoxantha*, y dos posiciones estuvieron sobre exones de *OCA2* y no se asociaron con cambios en ninguna especie de capuchino en particular.

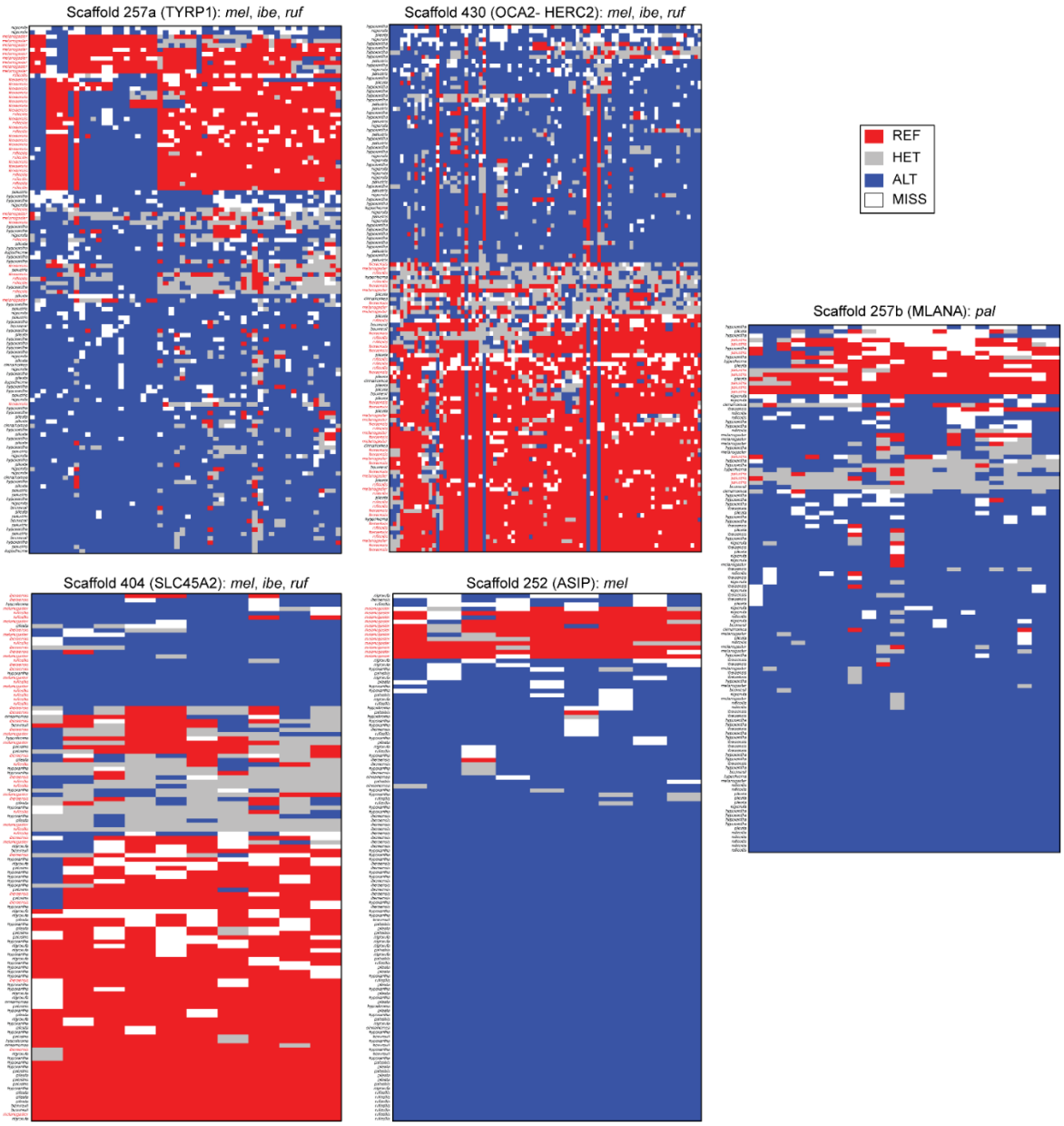


Figura 3.10: Genotipos de los 122 individuos secuenciados de las diez especies de capuchinos correspondientes a los *scaffolds* asociados con la variación en el contenido de EM y FM de las plumas de la garganta. Los genes de la melanogénesis se muestran al lado del nombre de cada *scaffold*, así como las especies que comparten el mismo color de garganta y los mismos genotipos en diferentes posiciones dentro del scaffold (los individuos de dichas especies están resaltados en rojo mientras que los individuos del resto de las especies están en negro). Nótese que en el *scaffold* 257a, *S. melanogaster* (garganta negra) posee genotipos ligeramente diferentes a los observados en *S. ruficollis* y *S. iberaensis* (que también tienen garganta negra). Otros detalles como en la **Figura 3.10**.

En muchos casos, las mismas regiones genómicas se asociaron con cambios en la coloración de diferentes parches de plumaje, en particular, el *scaffold* 252 (*ASIP*) estuvo involucrado en todas las asociaciones basadas en la concentración de EM y en los tres GWAS que mostraron picos claros de asociación con la concentración de FM. Sin embargo, una inspección más cercana reveló que en algunas regiones los SNPs asociados con distintos parches de plumaje se mapearon en áreas ligeramente diferentes alrededor de los genes candidatos (**Figura 3.11**). Por

ejemplo, en la región candidata del *scaffold* 252, los SNPs asociados con la variación del contenido de FM de la cabeza (ubicados entre las posiciones 45,19 y 45,75 kb), la nuca (ubicados principalmente entre las posiciones 45,94 y 46,32 kb) y el abdomen (ubicados entre las posiciones 46,76 y 48,59 kb) no se superpusieron (**Figura 3.11**). En otras regiones, los SNPs asociados con diferentes parches de plumaje sí se superpusieron en su distribución (por ejemplo, los SNPs asociados con el contenido de EM de la rabadilla y la garganta en el *scaffold* 430, **Figura 3.11**).

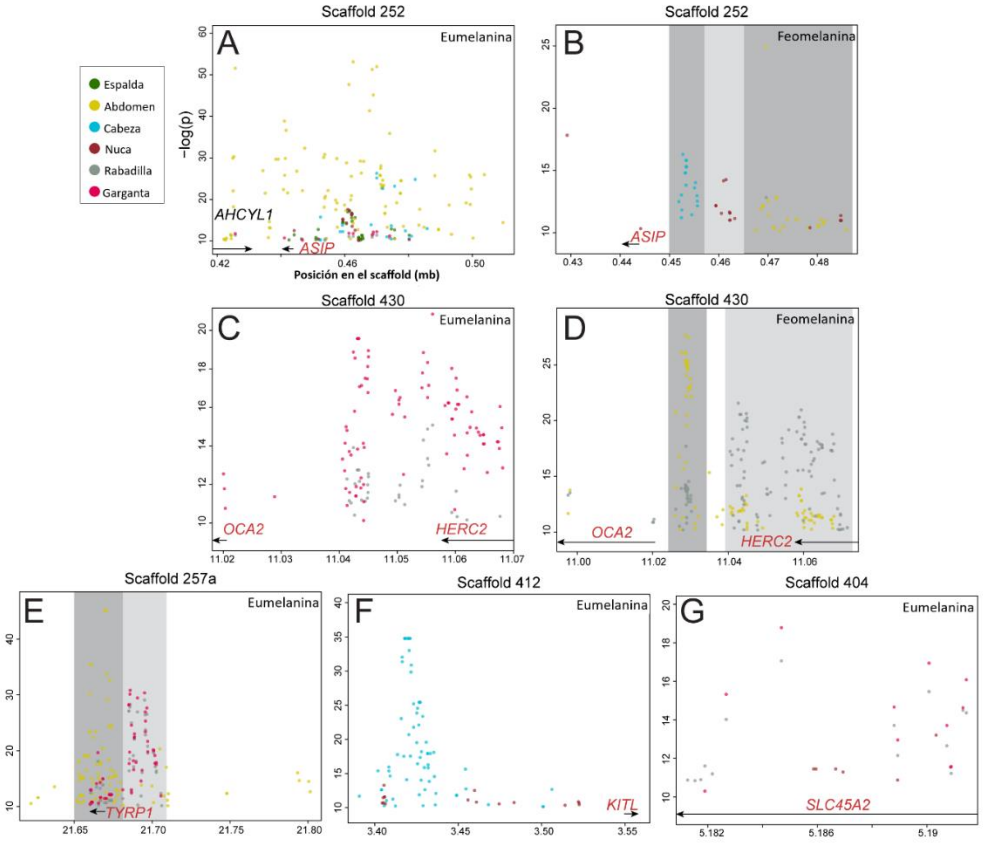


Figura 3.11. Zoom de las regiones genómicas asociadas repetidamente con la variación del contenido de EM y FM en varios parches de plumaje. Cada color representa un parche de plumaje, indicado en el recuadro superior izquierdo. Los recuadros grises indican SNPs agrupados asociados con un parche de plumaje en particular (los SNPs por debajo del umbral de significancia se omitieron para darle mayor claridad a los gráficos). Otros detalles como en la **Figura 3.4**.

3.4. CONCLUSIONES

En Campagna et al. 2017, y con un mayor número de especies en el capítulo II de esta tesis, se observó que muchas de las regiones genómicas de diferenciación entre los capuchinos -y de hecho las que más difieren- contienen genes involucrados en la melanogénesis. Esto implica que en este grupo de especies que se diferencian principalmente (y casi únicamente) en su coloración, son justamente los genes involucrados en la pigmentación de las plumas los que las

diferencian a nivel de su ADN. En este capítulo se profundizó sobre este sistema, apuntándose a resolver la base genética de la diversidad de patrones de coloración observada en el grupo. Es decir que más allá de saber que las especies difieren en los genes de melanogénesis, se avanzó en la comprensión de cómo varían dichos genes y cómo dicha variación afecta el color de cada parche de plumaje (y por ende el patrón de coloración de cada especie). La comprensión de este mecanismo es fundamental para entender la evolución de este grupo de especies y su radiación explosiva.

Para estudiar este mecanismo se asoció explícitamente la variación del contenido de EM y FM de las plumas de los principales parches de coloración de los capuchinos con las regiones de divergencia genómica entre las especies del grupo. Se descubrió que los cambios en los patrones de color están asociados con múltiples regiones genómicas, que en su mayoría se superponen con áreas de alta divergencia genómica interespecífica, y que comprenden un número acotado de regiones variables. Cada una de estas regiones se asoció con la variación del contenido de melaninas en diferentes parches de plumaje, aunque la combinación de áreas genómicas asociadas a cada parche fue única (la única excepción fueron las asociaciones con el contenido de EM de la rabadilla y la garganta). Los distintos parches de plumaje variaron en la cantidad de regiones genómicas que se asociaron con los cambios en el contenido de sus pigmentos, mostrando la mayoría de los parches fuertes asociaciones con varias regiones genómicas. Es interesante destacar que se observaron menos asociaciones (que además fueron estadísticamente menos significativas) entre las regiones genómicas y el contenido de FM que con el contenido de EM, y una baja superposición de las posiciones asociadas con el contenido de los dos tipos de melaninas. Estos resultados sugieren que la variación de color en los capuchinos puede deberse principalmente a la regulación del contenido de EM. Adicionalmente, para las asociaciones genómicas relacionadas con la variación en el contenido de EM de cada parche se vio que siempre el pico que mostró asociaciones estadísticas más fuertes contenía SNPs agrupados alrededor de un gen de melanogénesis, lo que en la mayoría de los casos también fue cierto para las asociaciones hechas en base a la variación en el contenido de FM.

Estos resultados muestran que la diversidad de patrones de plumaje de los capuchinos ha sido moldeada, al menos inicialmente, por el surgimiento de mutaciones en diferentes genes involucrados en la vía de la melanogénesis y su posterior selección, habiendo además probablemente interacciones epistáticas entre estos productos genéticos. Los genes encontrados en este capítulo también han sido identificados al estudiar la variación en caracteres de coloración en otras radiaciones evolutivas avianas (Abolins-Abols et al. 2018,

Stryjewski & Sorenson 2017, Toews et al. 2016, Uy et al. 2016). En este capítulo también se consiguieron identificar *GPR161*, *TBX19*, *DIO2* y *AHCY* como nuevos genes de pigmentación relacionados con las diferencias de coloración en los capuchinos (Baxter et al. 2019; **Tabla 3.2**). Sin embargo, excepto *AHCY*, que está estrechamente relacionado con *ASIP,* estos genes estuvieron implicados en menos comparaciones que los seis genes de coloración restantes (*OCA2*/*HERC2*, *ASIP*, *TYRP1*, *SCL45A2*, *MLANA* y *KITL*). Finalmente, ni en los análisis realizados en este capítulo, ni en los estudios previos de diferenciación genómica del grupo, se ha encontrado evidencia de que existan diferencias entre las especies de capuchinos en factores de transcripción que actúen como genes reguladores de patrones de coloración en el plumaje (como sucede por ejemplo en el género *Heliconius* de mariposas con el gen *optix*; Van Belleghem et al. 2017). Esto sugiere que los patrones de coloración de los capuchinos están controlados por diferencias en los mismos genes responsables de producir los pigmentos, y no por factores de transcripción que controlan su expresión.

Muchas de las regiones asociadas con los patrones de coloración que se encontraron en este capítulo coinciden con las regiones de diferenciación genómica elevada identificadas en Campagna et al. 2017 y en el Capítulo II. Sin embargo, existen algunas regiones de diferenciación alta que no están asociadas con caracteres de coloración, lo que sugeriría que la divergencia genómica del grupo no se limita a la coloración, sino que también podría incluir otros rasgos que varían entre estas especies, con bases genéticas que aún no se conocen (tales como las vocalizaciones, la elección de pareja, las preferencias de hábitat, etc.). Además, los análisis y la interpretación de los resultados de este capítulo se enfocaron únicamente en los picos que contenían grupos de al menos cinco SNPs con asociaciones significativas y como consecuencia de ello hubo numerosas asociaciones con una menor cantidad de SNPs significativos que no se exploraron en detalle. Por lo tanto, es posible que otras regiones, que quizás contengan genes de efecto pequeño, también influyan en los fenotipos del plumaje de los capuchinos.

Los estudios genómicos de este grupo de especies (Campagna et al. 2017, Capítulo II) han mostrado que la inmensa mayoría de las áreas de diferenciación genómica elevada entre los capuchinos se encuentran por fuera de las regiones codificantes. Por ello se piensa que se trata de regiones reguladoras que controlan la expresión génica. Aquí, se confirma que los SNPs asociados con cambios en el contenido de EM y FM se encuentran principalmente en regiones no codificantes, y también que la variación en el contenido de melaninas de varios parches de plumaje a menudo se puede asociar con la misma región genómica. Sin embargo, y más allá de que dicha región genómica interactúa con regiones diferentes para definir el color de cada

parche, también se ha observado que en muchos casos los SNPs que se asocian con cambios en el contenido de EM y FM en diferentes parches se agrupan en áreas ligeramente distintas en las cercanías de un gen. Por lo tanto, es probable que exista una variedad de elementos reguladores cerca de estos genes que controlen la expresión de los parches de plumaje de forma específica (Wallbank et al. 2016). Finalmente, también se ha encontrado una cantidad relativamente pequeñas de cambios que ocurren dentro de exones de genes de coloración que a menudo involucran a la mayoría de los individuos de una o dos especies, sugiriendo que, en menor medida, la variación en secuencias codificantes también podría contribuir a la coloración del plumaje de los capuchinos.

El análisis enfocado en tres especies que difieren únicamente en la coloración de su garganta -y que además son las que menos difieren genéticamente, ver Capítulo II- nos permitió comprender en mayor detalle el mecanismo de este sistema. Esto se debe a que dicho análisis de a pares de especies posibilitó confirmar que existen combinaciones específicas de genes involucradas en definir la coloración de cada parche, y demostrar además que los genes responsables del color del parche en cada especie dependen del color específico que tenga. Es decir que para los demás parches de plumaje pudimos, mediante el análisis de todas las especies en su conjunto, determinar los genes involucrados en su coloración, pero en el caso de la garganta además de eso se pudieron asociar variantes en genes específicos (o sus regiones regulatorias) con el color puntual que dicho parche tiene en cada especie. Así, las gargantas negras parecen ser consecuencia de cambios en *TYRP1* y *OCA2*, dos genes de melanogénesis relacionados con la variación en tonos marrones, grises y negros en aves (Abolins-Abols et al. 2018; **Tabla 3.2**). La garganta blanca de *S. palustris*, en cambio, se asoció con diferencias en *MLANA*, un gen importante durante la biosíntesis de los melanosomas (**Tabla 3.2**) conocido por expresarse diferencialmente en las plumas blancas de los juncos de ojos oscuros (*Junco hyemalis,* Abolins-Abols et al 2018) y de las palomas (*Columba livia*, Bruders et al 2020).

Los resultados de este capítulo muestran cómo cambios específicos en genes de la melanogénesis (y más específicamente en sus sitios regulatorios) se asocian con los cambios en la concentración de melaninas (EM y FM) de los diferentes parches de plumaje de los capuchinos, controlando así sus patrones de color. El hecho de que dichos patrones estén constituidos por un conjunto acotado y fijo de parches de plumaje, y que el contenido de EM y FM de las plumas (y por ende el color) esté asociado en cada parche con una combinación única de regiones genómicas, confirma la presunción del capítulo anterior sobre la modularidad de este sistema (para más detalles sobre sistemas modulares en aves, incluyendo aquellos que

definen la coloración, ver la revisión de Lewis & Van Belleghem 2020). Además, es importante destacar que la mayor parte de la variación genotípica observada ocurre sobre elementos reguladores *cis* de los genes en cuestión, y no sobre secuencias codificantes, lo que puede promover una rápida diferenciación fenotípica. La razón de esto es que las mutaciones en la secuencia codificante, si bien pueden ser beneficiosas en ciertos contextos de selección, tienen altas probabilidades de tener efectos negativos, limitándose así la capacidad de las secuencias codificantes de evolucionar rápidamente (Orteu & Jiggins 2020; Prud'homme et al. 2007). Tomados en su conjunto, los resultados de este capítulo permiten por lo tanto plantear con mayor solidez la propuesta del capítulo anterior, es decir que la modularidad de este sistema de determinación de los patrones de color ha sido fundamental en la rápida evolución de los capuchinos. Esto se debe a que si bien las variantes existentes en las regiones regulatorias de los genes involucrados en la melanogénesis originalmente se han generado por mutaciones *de novo*, posteriormente dichas variantes podrían recombinarse, por ejemplo, por eventos de hibridación, sin la necesidad de nuevas mutaciones, generando nuevos patrones de coloración (se utiliza el término *re-shuffling* en inglés para este fenómeno; Turbek et al. 2021; Lewis & Van Belleghem 2020). A su vez, dado el fuerte componente de selección sexual presente en este grupo, estos nuevos patrones -o morfos- tienden a no reproducirse con los previamente existentes a pesar de poder estar en simpatría con varios de ellos, comenzando así un proceso divergente que eventualmente puede conducir a la especiación de manera mucho más rápida que si se requiriesen nuevas mutaciones.

CAPÍTULO IV. DIFERENCIACIÓN Y VARIABILIDAD DE LAS VOCALIZACIONES DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR Y SUS POSIBLES CAUSAS

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. CARACTERES COMPORTAMENTALES COMO MECANISMOS DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO PRECIGÓTICO

Los caracteres comportamentales ligados al forrajeo, la migración, la preferencia de hábitat y la elección de pareja son fundamentales para mantener límites entre las especies (Uy et al. 2018). Cambios en estos caracteres pueden propiciar el surgimiento de barreras reproductivas que impulsen nuevos eventos de especiación (Boul et al. 2007, Price 2007, Seddon & Tobias 2010). Con frecuencia, estos mecanismos de aislamiento reproductivo han sido vinculados exclusivamente con la selección sexual diversificadora, pero lo más probable es que la selección sexual y la selección natural actuando conjunta y sinérgicamente sean las que impulsen su surgimiento en la naturaleza (Servedio & Boughman 2017).

En particular en las aves, los mecanismos de aislamiento reproductivo precigótico son considerados iniciadores de los mecanismos evolutivos que dan lugar a la formación de nuevas especies (Price 2007, Seddon 2008, Losos & Mahler 2010), desarrollándose mucho antes que los mecanismos postcigóticos. De hecho, estos últimos evolucionan de modo particularmente lento en las aves (Price & Bouvier 2002, Lijtmaer et al. 2003), lo que lleva a que no sean mecanismos que restrinjan necesariamente el flujo génico entre especies cercanamente emparentadas. En consecuencia, el estudio de los caracteres comportamentales como mecanismos de aislamiento es fundamental para entender cómo especies de aves estrechamente emparentadas coexisten con poca (o ninguna) hibridación en simpatría (Short 1969, Grant & Grant 1992).

4.1.2. RELEVANCIA DE LAS SEÑALES ACÚSTICAS EN LAS AVES

Las señales acústicas son consideradas caracteres honestos utilizados por diversos taxones en contextos muy diferentes, que incluyen el reconocimiento, la emisión de alarmas, la solicitud de alimento, la defensa de recursos y la elección de pareja (Catchpole & Slater 2003, Marler et al. 2004). A diferencia de otras señales (como las visuales o las táctiles) no precisan de proximidad para transmitirse, sino que pueden detectarse a distancia, proporcionando información certera sobre la identidad, la ubicación, e incluso las cualidades de su emisor sin contacto físico directo (Wilkins et al. 2013). En ornitología, la información contenida en el canto de las aves es de gran utilidad para responder una enorme variedad de preguntas ecológicas, comportamentales y

evolutivas. En base al canto, de hecho, es posible determinar relaciones filogenéticas y diferenciar especies crípticas, como ocurre por ejemplo en el orden *Tyranidae* (como los géneros *Empidonax*, *Elaenia* y *Serpophaga*), un grupo de aves cuyas especies son difícilmente reconocibles por su gran similitud morfológica (Johnson & Cicero 2002, Rheindt et al 2008).

En las aves, la adquisición del canto es aprendida en por lo menos tres grandes grupos: los paseriformes oscines (aves cantoras), los picaflores y los loros (órdenes *Passeriformes, Apodiformes* y *Psittaciformes,* respectivamente; Catchpole & Slater 2003). No obstante, el aprendizaje también podría jugar un papel importante en algunas especies de paseriformes suboscines (Kroodsma et al. 2013). Puntualmente en aves cantoras, las vocalizaciones tienen un componente genético (Seddon et al. 2005) y un componente aprendido, que ocurre mediante un proceso llamado *imprinting* en las etapas tempranas de la vida de los individuos, cuando son pichones y juveniles (Catchpole & Slater 2003, Irwin & Price 1999). En rasgos generales, durante el *imprinting* los machos aprenden a cantar los cantos de tutores (generalmente sus padres, aunque también de otros machos cercanos) mientras que las hembras aprenden a reconocer las vocalizaciones de estos (Irwin & Price 1999, Catchpole & Slater 2003).

Precisamente la dimensión cultural del canto lo convierte en un caracter vulnerable a la acumulación de nuevas variantes azarosas durante su aprendizaje (*mutación cultural*, Mason et al. 2017). De esta manera, la evolución cultural del canto facilitaría el surgimiento de nuevas variantes, o dialectos, que potencialmente podrían fijarse en la población en la que aparecen, diferenciando las poblaciones vocalmente y promoviendo así el desarrollo de barreras reproductivas incluso en ausencia de diferenciación genética (Lachlan & Servedio 2004, Wilkins et al. 2013, Mason et al. 2017). Por todo esto, las vocalizaciones son consideradas catalizadoras clave de los procesos de especiación y de la gran diversificación de especies de aves cantoras que se observa en la actualidad (junto con la coloración y otros atributos ornamentales; West-Eberhard 1983, Lachlan et al. 2004, Price 2007, Parker et al. 2012, Wilkins et al. 2013).

4.1.3. VARIABILIDAD DE LAS VOCALIZACIONES

Las vocalizaciones pueden variar entre los distintos ambientes, maximizando su transmisibilidad en el entorno particular en el que son utilizadas (Ryan et al. 1985, Catchpole & Slater 2003, Wilkins et al. 2013). Sin embargo, las modificaciones que éstas experimenten como respuesta a las características ambientales (y sus cambios en el tiempo) dependerán también de otros factores (**Figura 4.1**; Wilkins et al. 2013, Uy et al. 2018). Por un lado, se verán afectadas no solamente por el ambiente en sí mismo, sino también por la presencia de otros organismos que

utilicen el canal acústico (Catchpole & Slater 2003, Wilkins et al. 2013). Además, y dado que las señales acústicas son percibidas por otros receptores además de aquellos a los que están dirigidas, su estructura y amplitud estará también influenciadas por la presencia de predadores y parásitos/parasitoides, cuya presencia incluso puede en ciertos casos llevar a que se evite el uso del canal acústico (Zuk & Colluru 1998, Kirschel 2009, Tobias et al. 2010, Grant & Grant 2010).

A su vez, los sonidos que un ave puede emitir se ven limitados por la morfología y fisiología de cada especie, incluyendo su tamaño, aspectos de su sistema fonador (siringe) y el tamaño y forma del pico (Podos 1997, 2001, Podos et. al 2004. Lijtmaer 2008, Demery et al. 2021). En este sentido, de hecho, presiones de selección sobre estos caracteres morfológicos puedan afectar las vocalizaciones de una población. En ciertos casos, incluso, dicho efecto indirecto puede generar cambios relevantes en las vocalizaciones y propiciar el aislamiento de la población en cuestión. Un ejemplo clásico de este proceso lo constituyen -cuándo no- los pinzones de Darwin, en los que para ciertas especies se ha documentado cómo la presión ecológica relacionada con la alimentación ha moldeado los picos, y estos a su vez al modificarse han afectado

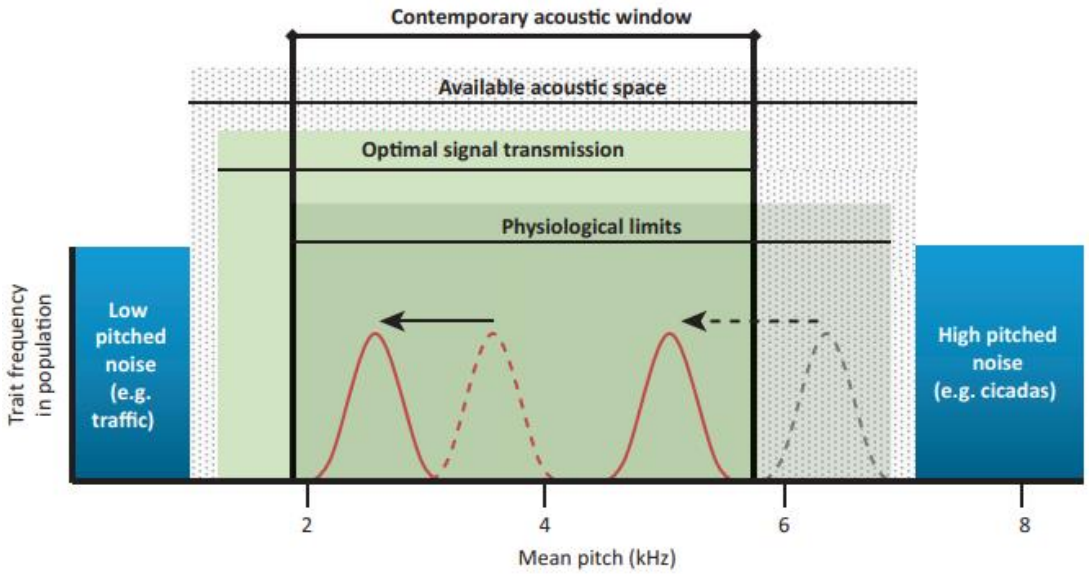


Figura 4.1: Ventana acústica efectiva para la evolución de las señales acústicas. Se ejemplifica la variación de las frecuencias (Khz) para un taxón en un ambiente determinado. La ventana acústica actual es producto del espacio acústico disponible, las restricciones fisiológicas, y la transmisibilidad de la señal. La flecha intermitente representa el desplazamiento de las frecuencias a una nueva ventana acústica desde un ambiente diferente que se encontraba sujeto a presiones de selección distintas. La flecha continua representa el desplazamiento de las frecuencias dentro de la misma ventana acústica como respuesta a procesos evolutivos inherentes al ambiente actual. Esquema tomado de Wilkins et al. 2013.

las vocalizaciones y llevado al aislamiento reproductivo y posterior especiación (Huber et al. 2006, Hendry et al. 2009, Podos et al. 2013).

Finalmente, cabe destacar que la evolución de las vocalizaciones, su diferenciación entre ambientes y su eventual divergencia entre poblaciones, dependerán también del modo en que los diferentes factores mencionados, y otros, se combinan en cada caso, siendo particularmente relevante comprender el balance entre selección natural, selección sexual y deriva (Wilkins et al. 2013).

4.1.4. DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES

El desplazamiento de caracteres reproductivos se encuentra ampliamente registrado en una gran variedad de taxones incluyendo principalmente insectos, murciélagos, anfibios y aves (ver citas en Wilkins et al. 2013). Este concepto consiste en la aparición de cambios pronunciados en los caracteres utilizados para el cortejo y el emparejamiento selectivo (como la coloración, la ornamentación y el canto) cuando dos o más especies se encuentran en simpatría respecto a cuando se hallan en alopatría (Brown & Wilson 1956). Este desplazamiento puede ocasionar tanto la convergencia como la divergencia de los atributos reproductivos de las especies (Price 2007, Uy et al. 2018) y es frecuente que ocurra cuando dos poblaciones entran en contacto secundario. Notablemente, es un mecanismo evolutivo vinculado asiduamente tanto con el inicio como con la finalización de los procesos evolutivos (Pfening 2009).

Dos o más especies pueden converger en sus señales acústicas cuando: a) tienen adaptaciones ecológicas similares a las presiones de un mismo ambiente (Seddon 2005, Derryberry 2009), b) existe un aprendizaje cruzado de las vocalizaciones y/o un flujo total o parcial de las mismas (causado por *imprinting*; Grant & Grant 1997) y c) ocurren eventos de introgresión genética (importante sobre todo en especies en donde el canto no es aprendido, como por ejemplo en las aves de la familia *Furnariidae*; Kirschel et al. 2019). Teóricamente, la convergencia en las señales acústicas de dos especies incrementaría los eventos de hibridación disminuyendo el *fitness* de los híbridos respecto a sus especies parentales (Price 2007). Sin embargo, la convergencia en el canto es un fenómeno ampliamente registrado en las aves (Wilkins et al. 2013, Uy et al. 2018). Algunas investigaciones sugieren que los efectos negativos de la convergencia acústica podrían ser compensados principalmente cuando: a) es importante defender territorios de heteroespecíficos que utilizan recursos similares (Reif et al. 2015), b) existen fuertes presiones ecológicas asociadas al ambiente (Seddon 2005, Derryberry 2009), y c) la convergencia es consecuencia indirecta de la adaptación de un carácter a otras presiones

de selección que tienen influencia en la producción del canto (como el tamaño y la forma del pico o el tamaño corporal; Hendry et al. 2009).

Por otro lado, el desplazamiento de caracteres también puede favorecer la divergencia en las señales acústicas de poblaciones simpátricas, impulsando el surgimiento de nuevos fenotipos vocales y la explotación diferencial del espacio acústico (**Figura 4.2**; Brown & Wilson 1956, West-Eberhard 1983, Pfening 2009). Esta divergencia contribuiría a eludir el costo de la hibridación (sobre todo cuando el mismo es muy alto; Liou & Price 1994) y de la competencia por el "nicho acústico", maximizando la transmisibilidad y el reconocimiento de las señales y sus mensajes (Brown & Wilson 1956, West-Eberhard 1983, Pfening 2009). Como resultado se conforman señales acústicas multidimensionalmente únicas y diferenciadas para cada especie (Nelson & Marler 1990). En aves se han reportado diferentes estrategias para el particionamiento del espacio acústico, incluyendo la variación de los parámetros acústicos del canto (por ejemplo, la frecuencia, el tiempo, y la forma de las notas; Krishnan & Tamma 2016, Chitnis et al. 2020) y la emisión del mismo desde distintos estratos ambientales (Chitnis et al. 2020) o en diferentes momentos del día (Luther 2008).

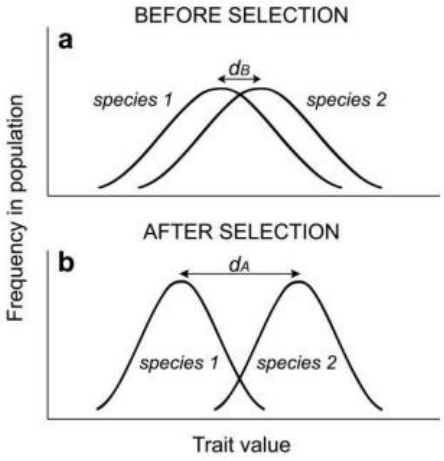


Figura 4.2: El proceso de desplazamiento de caracteres divergente. Al comienzo dos especies se encuentran en un ambiente y se solapan en el fenotipo de los caracteres reproductivos o en el uso de los recursos. Los individuos más disimilares con la especie simpátrica tienen más éxito que el resto de los individuos de la población y con el tiempo las especies aumentan su divergencia en el valor del carácter (pudiendo disminuir además la variación intraespecífica del mismo). Las diferencias en el valor del carácter son mayores luego de la selección (dA) que antes de la selección (dB). Esquema tomado de Pfennig 2009.

Las especies filogenéticamente cercanas tienden a poseer vocalizaciones y comportamientos en torno a las mismas más similares que las especies lejanas filogenéticamente (Coyne &Orr. 1995). Por esto, la interferencia acústica entre especies cercanas suele ser mayor que entre especies

lejanas, dando lugar al solapamiento de señales que favorecen eventos de hibridación y el desvanecimiento de las barreras reproductivas precigóticas (De Kort et al., 2002). En estos casos, el desplazamiento divergente de caracteres reproductivos es clave para sortear la interferencia interespecífica incrementando la diferenciación de las vocalizaciones en simpatría mucho más que en alopatría (Avital et al. 2000; Seddon 2005).

4.1.5. LAS VOCALIZACIONES DE LOS CAPUCHINOS DEL SUR

Los capuchinos del sur del género *Sporophila* poseen vocalizaciones elaboradas que, junto con los patrones de coloración, son utilizados para identificar a las especies del grupo (Ridgely & Tudor 1989). De hecho, las vocalizaciones permiten distinguir objetivamente no sólo a los capuchinos del sur de otros capuchinos (*S. castaneiventris* y *S. minuta*), sino también diferenciar a las especies del grupo, fundamentalmente en base los distintos tipos de notas de cada especie y las diferencias en la amplitud de frecuencia de las notas más sencillas (Campagna et al. 2011). Así mismo, también se ha descripto cierta diversidad intraespecífica en las vocalizaciones de algunos capuchinos con distribución geográfica amplia, como *S. hypoxantha* y *S. ruficollis*. Estas especies presentan dialectos asociados a localidades específicas que, se piensa, habrían surgido como consecuencia de la discontinuidad espacial que presentan, que a su vez está ligada a la variación geográfica en la disponibilidad recursos (Areta et al. 2011, Areta & Repenning 2011). Adicionalmente, como se ha mencionado en capítulos anteriores de esta tesis, experimentos a campo que simularon intrusiones territoriales han demostrado que los machos de *S. palustris*, *S.iberaensis* y *S. hypoxantha* son capaces de reconocer y responder diferencialmente al canto de individuos homoespecificos y heteroespecíficos (Benites et al. 2015, Turbek et al. 2021). No obstante, hasta el momento la mayoría de los estudios evolutivos del grupo se han enfocado en comprender el rol de la coloración durante su radiación, la relevancia de la misma en el aislamiento reproductivo precigótico y su base genómica (Benites et al. 2010, Campagna et al. 2017, 2018, Turbek et al. 2021, Capítulos II y III de esta tesis), habiendo sido las vocalizaciones mucho menos estudiadas.

Las vocalizaciones de los capuchinos están compuestas por una porción introductoria que es especie-específica y tiene en promedio tres notas sencillas. A esta introducción le sigue una secuencia de notas más complejas susceptibles a variar levemente entre los individuos. Las notas usadas en esta segunda parte del canto pueden repetirse aisladamente como llamadas, tanto en machos como en hembras, en diferentes contextos (Repenning et al. 2010, Areta et al. 2011). De hecho, en base a estas notas es posible diferenciar a las hembras de las distintas especies en los sitios de invernada que, de otro modo, son indistinguibles en el campo

(Repenning & Fontana 2019). Las observaciones directas en la naturaleza indican que la introducción y en ocasiones los fragmentos cortos de la segunda parte de los cantos son emitidos cuando los machos se encuentran relajados (frecuentemente durante el forrajeo). No obstante, cuando los machos se encuentran excitados y disputando territorios producen repetidamente los cantos completos, con mayor énfasis y velocidad (Repenning et al. 2010, observaciones personales).

En este capítulo se estudiaron las vocalizaciones de *S. hypoxantha*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. iberaensis*, es decir las cuatro especies de capuchinos focales de esta tesis. Las mismas difieren fenotípicamente en su coloración y en sus vocalizaciones, y además son capaces de utilizar estas últimas para el reconocimiento especie-específico y posiblemente también durante el emparejamiento selectivo (Benites et al. 2015, Turbek et al. 2021). Durante su temporada reproductiva, estas especies se distribuyen fundamentalmente en el norte y centro de Argentina con un solapamiento variado, encontrándose en diferentes estados de simpatría y alopatría, lo que permiten analizar posibles escenarios de desplazamiento de caracteres vocales. Al finalizar la temporada reproductiva migran en bandadas mixtas a la región del Cerrado y a las sabanas de Humaitá al norte de la Amazonía en Brasil (como el resto de los capuchinos y otras especies del género; Areta et al. 2012, Vicentín- Bugoni et al. 2013, Di Giacomo et al. 2016), en donde interactúan en un contexto muy diferente del reproductivo.

4.1.6. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL CAPÍTULO

El primer objetivo general de este capítulo es estudiar las propiedades acústicas de las vocalizaciones de *S. hypoxantha*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. iberaensis* y contrastar las mismas interespecíficamente. El segundo objetivo general es comparar las vocalizaciones de diferentes poblaciones de cada una de las especies en distintos escenarios de simpatría y alopatría, analizando si las mismas presentan desplazamiento de caracteres y evaluando el efecto de la distancia geográfica sobre su estructura. Estos objetivos pueden desglosarse y formalizarse del siguiente modo:

1) Caracterizar y contrastar las vocalizaciones de *S. hypoxantha*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. iberaensis* analizando objetivamente distintos parámetros acústicos de los cantos y de los elementos que los componen.
2) Caracterizar las diferencias intraespecíficas en las vocalizaciones de las cuatro especies focales considerando los parámetros acústicos de los cantos y sus elementos.

3) Evaluar específicamente la presencia de desplazamiento de caracteres reproductivos. Esto se hará de dos maneras: 3a) Contrastando para cada especie las señales acústicas de las poblaciones que se reproducen simpátricamente con otros capuchinos en comparación con sus propias poblaciones alopátricas; 3b) Evaluando el solapamiento del espacio acústico entre las especies de capuchinos dependiendo de si las mismas están en alopatría o simpatría.
4) Estudiar para cada una de las cuatro especies focales el efecto de la distancia geográfica entre poblaciones sobre la diferenciación de sus vocalizaciones. Esto se analizará tanto mediante el estudio de las variables del canto de las poblaciones como evaluando el solapamiento del espacio acústico de las mismas.

En el contexto de los objetivos del capítulo y los antecedentes mencionados, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

H1) *S. hypoxantha*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. iberaensis* se pueden distinguir en base a los atributos acústicos de sus cantos y/o de los elementos que los componen.

H2) Cuando dos o más especies de capuchinos se reproducen en simpatría, cada una de ellas difiere significativamente en las propiedades acústicas de su canto respecto a cuando se reproduce en alopatría, de modo tal de minimizar la interferencia generada por las señales acústicas de las otras especies del grupo.

H3) La diferenciación de los parámetros acústicos de las vocalizaciones entre las poblaciones de las especies de capuchinos correlaciona positivamente con la distancia geográfica.

H4) El grado de solapamiento del espacio acústico que existe entre las diferentes poblaciones muestreadas correlaciona negativamente con la distancia geográfica que existe entre las mismas.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. MUESTREO

Durante dos temporadas reproductivas (2018-2019 y 2019-2020) se realizaron campañas científicas de grabación entre los meses de noviembre y febrero. Las localidades de muestreo se eligieron en base a los avistamientos registrados en la plataforma *ebird* (*ebird.org*) durante las últimas cinco temporadas reproductivas previas al muestreo (entre los años 2013 y 2017). Las localidades muestreadas para esta tesis fueron las siguientes (**Figura 4.3**):

a) **Parque Nacional Iberá** (Provincia de Corrientes): sitio en donde *S. hypoxantha, S. palustris y S. iberaensis* tienen poblaciones abundantes y simpátricas durante su temporada reproductiva; y en donde además se ha observado que se reproducen en

territorios contiguos (Turbek et al. 2021). Las poblaciones de este sitio se denominaron por simplicidad con una abreviatura que combina el epíteto específico de la especie y las iniciales del sitio: *hypox-EI* (*S. hypoxantha*), *pal-EI* (*S. palustris*) e *ibe-EI* (*S. iberaensis*).

b) **Perdices** y **Gualeguaychú** (Provincia de Entre Ríos): localidades en donde *S. hypoxantha*, *S. ruficollis* y *S. palustris* son simpátricas. Las poblaciones de este sitio se abreviaron como *hypox-ER* (*S. hypoxantha*), *rufi-ER* (*S. ruficollis*) y *pal-ER* (*S. palustris*).

c) **Esperanza** (Provincia de Santa Fe): localidad en donde se ha reportado la ocurrencia de *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* (ver *ebird.org*), pero en donde se encontraron únicamente individuos de *S. ruficollis* en enero de 2019 luego de una exhaustiva exploración de la localidad. La población de este sitio se abrevió como *rufi-E*.

d) **Mar Chiquita** (Provincia de Córdoba): sitio en donde se reproducen simpátricamente *S. hypoxantha* y *S. ruficollis*. Las poblaciones de este sitio se abreviaron como: *hypox-MC* (*S. hypoxantha*) y *rufi-MC* (*S. ruficollis*).

e) **San Lorenzo Chico** y **Salta capital** (Provincia de Salta): Sitio en donde se encuentra únicamente, y en abundancia, *S. ruficollis*. La población se denominó *rufi-S.*

En cada localidad se buscaron activamente machos de las especies focales en pastizales no antropizados, parches de pastizal o al borde de los caminos (donde se encuentran con frecuencia cuando los pastizales naturales han sido reemplazados por cultivos y los bordes mantienen la única vegetación nativa). En la mayoría de las ocasiones los individuos se localizaron porque cantaban activamente, y solo en muy pocos casos el hallazgo de los mismos fue por avistamiento. Una vez identificados los individuos se corroboró que se tratara de machos con plumaje reproductivo completo. Los individuos se grabaron con un grabador Tascam HD-P2 y un micrófono direccional Senheizer a una distancia de entre diez y 15 metros durante cinco minutos (o hasta que terminaran el canto luego de esos cinco minutos). El número de cantos grabados durante ese tiempo varió entre los individuos y fue un dato tenido en cuenta en los análisis estadísticos. Ya que los individuos grabados no fueron capturados ni identificados con marcas, se evitó grabar sujetos de la misma especie que se encontraran a menos de 200 metros de individuos ya muestreados. Las grabaciones se depositaron en la Colección Nacional de Sonidos Naturales de la División de Ornitología del MACN. En la **Tabla Suplementaria 4.1** se detallan las grabaciones utilizadas.

Figura 4.3: Localidades muestreadas y especies focales de capuchinos del sur que se reproducen en ellas de acuerdo con los registros de *ebird.com*.

4.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS GRABACIONES Y VARIABLES MEDIDAS

Las grabaciones se comprimieron por simplicidad al formato "*mono*" (en lugar de "*stereo"*) y se convirtieron del formato *.wav* al *.txt* para poder procesarlas tanto con el programa *Raven Sound Analysis* versión *1.5* (de aquí en adelante *Raven*; Bioacoustics Research Program 2017), como en R versión 4.0.3 (R Core Team, 2022). Los archivos pertenecientes a una misma especie se concatenaron en R en un archivo único (conservando los datos del origen de cada grabación) con el paquete *Rraven* (Araya-Salas 2017), un programa que facilita el intercambio de datos entre R y *Raven,* así como la automatización de los análisis de sonidos que ejecuta *Raven*. Dichos archivos se abrieron en *Raven* como una secuencia de páginas (*page size* = 60 segundos, *page increment* = 90%, *step increment* = 10%) y se visualizaron como espectrogramas. Los espectrogramas se generaron con los siguientes parámetros: tamaño de ventana: 512 puntos, solapamiento de ventanas: 90%, ventana tipo Hann, resolución temporal: 1,161 ms y resolución de frecuencia: 86,1 Hz. y luego se visualizaron con un brillo del 40% y un contraste del 60%.

Para procesar las vocalizaciones en *Raven*, se consideró elemento (o nota) a una traza única y continua en el espectrograma, separada de otros elementos por una interrupción visible en el tiempo. Las vocalizaciones constituidas por solo un elemento se consideraron "llamadas" y no fueron analizadas en esta tesis. El resto de las vocalizaciones de cada grabación se clasificaron

como “cantos simples” (introducción del canto) cuando estuvieron compuestas por entre dos y cuatro elementos, y como “cantos complejos” cuando estuvieron compuestas por un número mayor de elementos (ver **Sección 4.1.6**, **Figura 4.4**; ver **Figuras Suplementarias 4.1-4.6** para observar las sintaxis típicas de los cantos simples y complejos de las poblaciones muestreadas). Con la función *selection mode* de *Raven* se seleccionaron todos los elementos de los cantos (simples y complejos), dejando fuera de dicha selección solamente aquellos elementos que resultaron indistinguibles por superponerse con ruido de fondo o por ser muy tenues. Se conservaron solo cantos completos, es decir, únicamente cantos que tuvieran todos sus elementos seleccionados. Así mismo se dejaron fuera del análisis los cantos que comenzaron antes de iniciar la grabación. Finalmente, se consideraron elementos de un mismo canto aquellos separados temporalmente entre sí por hasta un segundo.

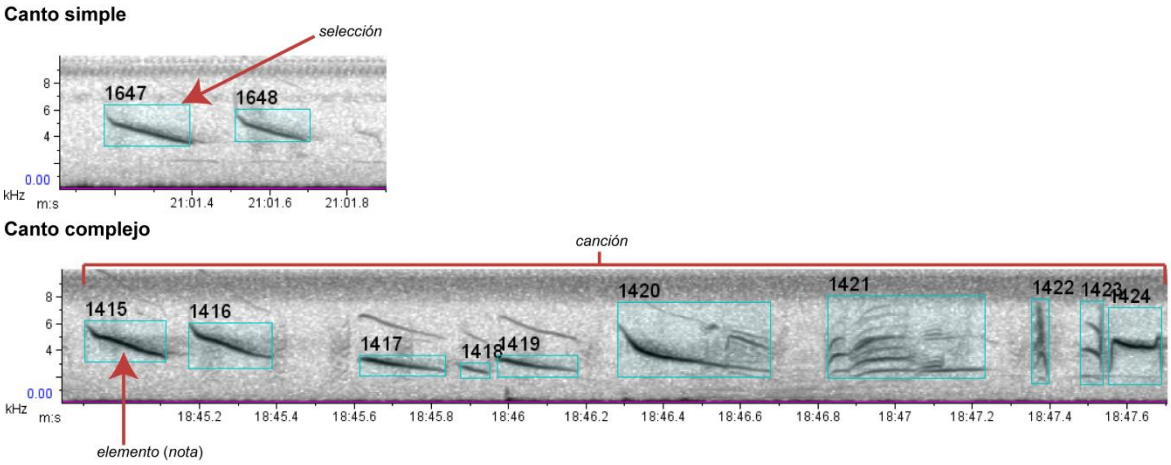


Figura 4.4: Espectrogramas ejemplificando cantos simples y complejos. La señal acústica se representa como la frecuencia (en kHz, eje Y) en función del tiempo (en ms, eje X). Las vocalizaciones pertenecen a individuos de la población *pal-EI*. En celeste se resaltan las selecciones hechas en *Raven* para cada elemento y se muestra su número de identificación. El conjunto de elementos (o notas) separados entre sí por menos de un segundo forman un canto.

En base a las selecciones hechas se crearon tablas con la función *selection table* de *Raven*. Dichas tablas contuvieron información acústica basada en estimaciones de energía que hace *Raven* para cada selección (métricas de tiempo y frecuencia) e información identificadora inherente a cada selección (especie, individuo, número de grabación, etc). Las tablas de selección se importaron a R con el paquete *Rraven*. Para corroborar que las selecciones fueron realizadas correctamente, con el programa *warbleR* (Araya-Salas & Smith-Vidaurre 2017) y su función *spectrograms* se graficaron los espectrogramas de todas las grabaciones y las selecciones hechas sobre ellos. Estos gráficos permitieron identificar rápidamente si alguna nota o canto habían sido pasados por alto, y también (ya que esta exploración permite revisar varios cantos a la vez)

identificar notas y/o cantos dudosos que pudieran pertenecer (por ejemplo) a otra especie que haya sido grabada accidentalmente mientras cantaba el individuo focal.

4.2.3. OBTENCIÓN DE MÉTRICAS DE CANTO

ESTIMACIÓN DE VARIABLES ACÚSTICAS A NIVEL DE ELEMENTOS

Para cada selección se estimaron con *Raven* variables acústicas robustas de tiempo y frecuencia (basadas en la energía de los elementos) y con *warbleR* (en R) variables acústicas adicionales. Cuando dos o más variables estuvieron fuertemente correlacionadas ($r > |0{,}95|$), se seleccionó una al azar y se removió al resto. Con las variables acústicas retenidas se crearon dos datasets (uno para cantos simples y otro para cantos complejos) que se usaron en análisis posteriores (ver detalle y descripción de las variables acústicas en la **Tabla 4.1**).

ESTIMACIÓN DE VARIABLES ACÚSTICAS A NIVEL DE CANTOS

En base a los dos conjuntos de datos construidos en torno a las variables acústicas elementales se crearon dos nuevos datasets con variables acústicas calculadas por canto. Dichas variables se estimaron con *warbleR* en R y fueron: el "número de elementos" (número de elementos o notas que constituyeron el canto), la "duración de los elementos" (longitud promedio de los elementos del canto), la "duración del canto" (diferencia entre los tiempos de inicio y fin del canto), la "tasa de canto" (número de elementos por segundo), la "duración de los intervalos" (promedio de la duración de los silencios entre los elementos del canto), el "rango de frecuencia mínima 5% y máxima 95%" (diferencia entre la frecuencia máxima y la mínima, estimada en kHz), "*meanpeakf*" (frecuencia pico promedio, es decir, frecuencia con la energía más alta del espectro de frecuencias medias) y "*mst*" (*minimum spanning tree*, medida de diversidad de los elementos). Cabe explicar que "*mst*" se estima en base a la distancia promedio entre todos los elementos dentro de un canto en un espacio acústico generado por los dos primeros componentes principales (construidos en base a las variables acústicas individuales de los elementos que componen el canto, Keen et al. 2021).

REVISIÓN DE LOS DATASETS

Los datasets y las variables contenidas en ellos se exploraron siguiendo los protocolos propuestos por Zuur el al. 2010. Durante este proceso se removieron las selecciones con valores nulos (selecciones accidentales) y se identificaron *outliers* con gráficos Cleveland. Mediante gráficos de cajas e histogramas se indagó en R la homocedasticidad y la normalidad univariada de un subconjunto de las variables acústicas estimadas ("Delta.Time..s", "Peak.Freq..Hz",

"BW.90...Hz", "PFC.Avg.Slope..Hz.ms", "time.Q25", "entropy", "meandom") en función de las poblaciones. Los parámetros evaluados mostraron varianzas heterogéneas entre las poblaciones (causadas posiblemente por la diferencia en el tamaño muestral de las mismas). Por otro lado, excepto las variables de contorno de frecuencias pico, las variables acústicas siguieron una distribución normal.

Finalmente se removieron las poblaciones representadas por tres cantos o menos por considerarse que tenían muy baja representatividad acústica. De acuerdo con este criterio, se eliminó del dataset de "cantos simples" a la población *pal-ER* (dos cantos simples en total); y del dataset de "cantos complejos" a las poblaciones *pal-ER*, *rufi- MC* y *rufi- E* (que tuvieron hasta tres cantos complejos cada una). El detalle del número de individuos, número de cantos y número de elementos final para el dataset de "cantos simples" (80 individuos, 99 cantos, 1168 elementos) y el de "cantos complejos" (80 individuos, 101 cantos, 4424 elementos) se muestra en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4. 1: Variables acústicas elementales medidas en este capítulo. En las columnas se indica el programa con el que se estimaron y la clase de variable a la que pertenecen. Se incluye también una breve descripción de las mismas (información recuperada de los manuales de *Raven* y *warbleR*; Charif et al. 2003, Araya-Salas & Smith-Vidaurre 2017).

Programa	Tipo de variable	Nombre de la variable	Definición de la variable
Raven	Temporal	***Delta Time s***	Diferencia entre el tiempo de inicio y el de finalización de la selección (en seg).
		Dur 90 s.	Diferencia estimada en segundos entre el tiempo 5% (momento en el que el elemento alcanza en la selección el 5% de la energía) y el tiempo 95% (momento en el que en la selección el elemento supera el 95% de la energía).
		IQR Dur s.	Diferencia estimada en segundos entre el tiempo que lleva alcanzar el primer intercuartil de la selección (momento en el que se supera el 25% de la energía total del elemento en la selección) y el tercer intercuartil (momento en el que se supera el 75% de la energía total del elemento en la selección).
	Frecuencia	***Q1 Freq Hz***	Frecuencia estimada en hertz que divide la selección en dos intervalos de frecuencia que contienen el 25% y el 75% de la energía total del elemento en la selección, es decir, es la frecuencia a la que se supera el 25% de la energía total del elemento en la selección.
		Freq 5 Hz.	Frecuencia estimada en hertz que divide la selección en dos intervalos de frecuencia que contienen el 5% y el 95% de la energía total del elemento en la selección, es decir, es la frecuencia a la que se supera el 5% de la energía total del elemento en la selección.
		Freq 95 Hz.	Frecuencia estimada en hertz que divide la selección en dos intervalos de frecuencia que contienen el 95% y el 5% de la energía total del elemento en la selección, es decir, es la frecuencia a la que se supera el 95% de la energía total del elemento en la selección.
		IQR BW Hz	Diferencia estimada en hertz entre "Q1 Freq..Hz" y "Q3.Freq..Hz" (frecuencia a la que se supera el 75% de la energía total del elemento en la selección).
		BW 90 Hz.	Diferencia estimada en hertz entre la "Freq 5%" y la "Freq 95%". Es el ancho de banda que contiene el 90% de la energía del elemento de la selección.
		Peak Freq Hz.	Frecuencia máxima del elemento en la selección estimada en hertz.
	PFC*	***PFC Avg Slope Hz ms***	Estimación en Hz/mseg del promedio de las pendientes en las que ocurre la frecuencia máxima en las porciones de la selección.
		PFC Min Freq Hz	Estimación en hertz de la frecuencia mínima de la porción de la selección en la que ocurre la frecuencia máxima.
		PFC Min Slope Hz ms	Estimación en Hz/mseg de la pendiente mínima en donde ocurre frecuencia máxima en las porciones de la selección.
		PFC Max Freq Hz	Estimación en hertz de la frecuencia máxima de la porción de la selección en la que ocurre la frecuencia máxima.
		PFC Max Slope Hz m	Estimación en Hz/mseg de la pendiente máxima en donde ocurre frecuencia máxima en las porciones de la selección.

warbleR	**Frecuencia**	***sd***	Desviación estándar de la frecuencia (en kHz).
		Freq IQR	Rango de frecuencias entre la frecuencia a la que se supera el 25% de la energía total del elemento en la selección y la frecuencia a la que se supera el 95% (en kHz).
		dfrange	Rango de la frecuencia dominante de la señal acústica medida a través de la señal del elemento.
	Frecuencia espectral	***meandom***	Promedio de la frecuencia dominante de la señal acústica.
		mindom	Mínimo de la frecuencia dominante de la señal acústica.
		maxdom	Máximo de la frecuencia dominante de la señal acústica.
		modindx	Índice de modulación. Estimado como la relación entre la diferencia absoluta entre dos frecuencias dominantes adyacentes y el rango de frecuencia entre ellas.
		startdom	Frecuencia dominante al comienzo de la señal.
		enddom	Frecuencia dominante al final de la señal.
		meanpeakf	Frecuencia con la energía más alta del espectro de frecuencia media.
	Tiempo	***Time median***	El tiempo (en segundos) en el que la selección se divide en dos elementos que contienen igual cantidad de energía.
		Time Q25	El tiempo (en segundos) en el que la selección se divide en dos intervalos de tiempo que contienen el 25% y el 75% de la energía.
	De forma y energía espectral.	***skew***	Asimetría del espectro.
		kurt	Picos del espectro.
		Time ent	Distribución de energía en el tiempo.
		entropy	Entropía espectral de la selección.
		sfm	Planitud espectral.
		dfslope	Pendiente del cambio en la frecuencia dominante a través del tiempo (estimado como kHz/seg).

*Las estimaciones basadas en contornos de frecuencias (PFC) indican de qué manera la forma y el contorno de los elementos cambian con el tiempo. Al dividir el espectrograma de cada elemento en pequeñas porciones y estimar variables derivadas para cada una de estas porciones las PFC miden el cambio de la señal en el tiempo (ver https://ravensoundsoftware.com/knowledge-base/pitch-tracking-frequency-contour-measurements).

Tabla 4.2: Tamaños muestrales finales. Número de individuos, de cantos y de elementos para cantos simples y complejos de las especies estudiadas en cada uno de los sitios en los que se grabaron vocalizaciones.

Tipo de canto	Especie	Sitio de muestreo	N° individuos	N° cantos	N° elementos
Simple	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	18	116	326
		Entre Ríos	8	43	108
		Mar Chiquita	4	32	83
	S. ruficollis	Entre Ríos	13	76	239
		Esperanza	6	46	125
		Mar Chiquita	7	28	81
		Salta	7	32	67
	S. palustris	Esteros del Iberá	12	30	90
	S. iberaensis	Esteros del Iberá	5	18	49
Complejo	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	13	60	442
		Entre Ríos	10	43	341
		Mar Chiquita	2	24	165
	S. ruficollis	Entre Ríos	9	17	105
		Salta	11	39	610
	S. palustris	Esteros del Iberá	29	170	2152
	S. iberaensis	Esteros del Iberá	6	34	609

4.2.4. PARÁMETROS ACÚSTICOS Y SU VARIACIÓN ENTRE ESPECIES Y POBLACIONES

Con el propósito de reducir la dimensionalidad de los dataset y detectar patrones no evidentes en el análisis individual de cada variable acústica, se realizaron análisis de componentes principales con el paquete *stats* en R sobre la matriz de correlación de las variables. El número de componentes principales a retener se estimó con gráficos tipo *screeplot* realizados con el programa *ggplot2* (Wickham 2016) en R. Los resultados de este análisis de ordenamiento se representaron gráficamente como *biplots* con *ggplot2* en función de las especies y de las poblaciones. Para interpretar con mayor facilidad cuánto contribuyeron las variables acústicas originales a los ejes retenidos se estimaron correlaciones entre ambos. Finalmente, con los valores de los análisis de componentes principales se crearon cuatro nuevos datasets para cantos simples y complejos (dos a nivel de elementos y dos a nivel de cantos).

Para determinar si las variables de canto cambian entre las especies y las poblaciones de capuchinos del sur estudiadas, se llevaron a cabo modelos lineales mixtos con el paquete *nlme* (Pinheiro et al. 2022) en R. En estos modelos la variable dependiente fue uno de los componentes principales retenidos y las variables independientes fueron, según correspondiese, las especies o las

poblaciones. De esta forma se evaluó el efecto de las especies y las poblaciones sobre los distintos ejes que sintetizaron la información de las variables acústicas de las vocalizaciones de los capuchinos. Se tuvo en cuenta también el efecto aleatorio de las localidades, los individuos y el número de canto (para los análisis de variables acústicas elementales) del cual provenía cada observación. Para todos los modelos se probaron los supuestos de homogeneidad y de normalidad de la varianza entre las especies y poblaciones contrastadas tanto gráficamente (gráfico de residuos versus predichos y *qqplot*) como analíticamente (pruebas de Levene y de Shapiro- Wilk). En los casos en que no se cumplió el supuesto de homogeneidad de la varianza, la misma se modeló para cada especie o población contrastada con la función *varIdent* del paquete *nlme.* Se seleccionaron como los mejores modelos aquellos que tuvieron valores menores de AIC (*Akaike information criterion*). Finalmente, se realizaron comparaciones a posteriori de cada modelo con el paquete *emmeans* (Lenth et al. 2022) y los contrastes de a pares (de especies o poblaciones) se graficaron con *ggplot2*. Las sintaxis en R de los modelos finales se muestran en la **Tabla Suplementaria 4.2.**

4.2.5. ESTUDIO DE LOS ESPACIOS ACÚSTICOS DE LA POBLACIONES MUESTREADAS

En una aproximación complementaria a los análisis anteriores y con el objetivo de comprender si las vocalizaciones de las especies de capuchinos del sur estudiadas se ven afectadas por la presencia de otras especies en la misma localidad se cuantificaron algunas características de los espacios acústicos de las poblaciones muestreadas usando el paquete *PhenotypeSpace* (Araya-Salas & Odom 2022) en R. Estas estimaciones se hicieron en base a los cuatro conjuntos de datos que resumen las variables acústicas elementales y por canto (de cantos simples y complejos) en componentes principales (ver **Sección 4.2.4**), e incluyeron las poblaciones de todas las localidades muestreadas para obtener resultados comparables.

Sobre el espacio acústico bidimensional (conformado por PC1 Y PC2) de las poblaciones de capuchinos del sur estudiadas se calculó con *PhenotypeSpace* en R el grado de solapamiento promedio de los espacios acústicos de todas las poblaciones con la función *space_similarity* usando la opción *proportional.overlap.* Esta función calcula la proporción de los espacios acústicos (estimados como áreas de *mcp*) que se hayan superpuestos entre dos poblaciones (área superpuesta entre poblaciones/área total de los espacios acústicos de ambas poblaciones; Araya-Salas & Odom 2022). El método de *mcp* dibuja un polígono alrededor de cada uno de los elementos/cantos de una población y calcula su área. Para evitar los posibles sesgos causados por

el muestreo desbalanceado, los cálculos de solapamiento promedio se hicieron aplicando rarefacciones (de 100 iteraciones). La rarefacción es una técnica de normalización que implica el submuestreo aleatorio de observaciones desde la muestra inicial hasta un tamaño de muestra normalizado seleccionado (Sanders 1968), que en este caso fue el tamaño de la población de capuchinos más pequeña del dataset. Los resultados con y sin la rarefacción estuvieron fuertemente correlacionados (~90-95% en todos los casos).

Con el propósito de evaluar el efecto de la especie y de la coexistencia geográfica (simpatría o alopatría) entre las poblaciones sobre el solapamiento de los espacios acústicos de las poblaciones se llevaron a cabo modelos lineales con *lme4* (Bates et al. 2015) en R. En estos modelos la variable dependiente fue la proporción de solapamiento de los espacios acústicos de las poblaciones y las variables independientes fueron especie y coexistencia. Los modelos lineales se desarrollaron como en la **Sección 4.2.4.**, seleccionando los mejores modelos con el criterio *AIC* (sintaxis para R de los modelos seleccionados en **Tabla Suplementaria 4.3)**.

4.2.6. EFECTO DE LA DISTANCIA GEOGRÁFICA SOBRE LAS VOCALIZACIONES DE LOS CAPUCHINOS

EFECTO SOBRE LAS VARIABLES ACÚSTICAS

Con el paquete *ade4* (Dray & Dufour 2007) en R, y utilizando los datos de latitud y longitud de los individuos, se construyeron para cada especie dos matrices de distancia geográfica, una para cantos simples y otra para cantos complejos. Así mismo, con la función *dist* se estimaron las distancias euclídeas de las variables acústicas sintetizadas en componentes principales entre todas las observaciones (elementos o cantos) de cada dataset. Esto se hizo para todos los componentes retenidos en cada dataset. Las matrices de distancia entre las variables acústicas (elementales y por canto) y las matrices de distancia geográfica se contrastaron con pruebas de Mantel individuales para cada una de las cuatro especies estudiadas.

EFECTO SOBRE EL SOLAPAMIENTO ACÚSTICO DE LAS POBLACIONES

Se estimó la latitud y la longitud promedio de cada población de capuchinos del sur muestreada y con el paquete *ade4* se construyeron dos matrices de distancia geográfica promedio entre las poblaciones, una para cantos simples y otra para complejos. Con el paquete *PhenotypeSpace* los resultados de solapamiento de espacios acústicos entre pares de especies se transformaron en matrices de similitud. Como las pruebas de Mantel requieren contrastar matrices de distancia o

disimilitud, las matrices de solapamiento se transformaron en matrices de disimilitud restando a uno la proporción de solapamiento. Finalmente, se realizaron pruebas de Mantel para estimar el efecto de la distancia geográfica entre las poblaciones sobre la proporción de solapamiento de los espacios acústicos. Este análisis se sumó al estudio del solapamiento de las vocalizaciones entre las poblaciones detallado en la sección anterior (4.2.5).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. CONSIDERACIONES SOBRE EL MUESTREO

En algunos sitios de muestreo no se encontraron todas las especies reportadas en *ebird* a pesar de haber hecho una exploración exhaustiva de los mismos durante las campañas científicas. Aunque en años anteriores los avistamientos de *S. palustris* en Perdices y Gualeguaychú (Provincia de Entre Ríos) fueron abundantes, solo se hallaron dos individuos en diciembre de 2019. Esta situación fue corroborada por avistadores de aves y naturalistas que visitan la zona asiduamente. Así mismo, si bien *S. hypoxantha* es una especie reportada en Esperanza (Provincia de Santa Fe) solo se localizaron individuos de *S. ruficollis* en la localidad. No haber encontrado una especie en una localidad no implica que la especie no se reproduzca en la misma en otro momento, por lo que para nuestros análisis de simpatría vs. alopatría de todos modos se consideró a estos sitios como lugares en los que se encuentran en simpatría todas las especies reportadas en *ebird*, más allá de que las hayamos encontrado o no en nuestro trabajo de campo. Las temporadas reproductivas de las aves se encuentran limitadas frecuentemente por la disponibilidad de recursos (Dawson 2008), por lo que cambios en, por ejemplo, las precipitaciones (Studds & Parra 2011) o el uso de los terrenos en donde estas especies establecen sus territorios pueden haber provocado el desplazamiento a otras localidades cercanas o bien el retraso (o incluso la suspensión) de sus temporadas reproductivas (De Cáceres et al 2013). Por otro lado, comúnmente los reportes en *ebird* se basan únicamente en registros visuales, lo que puede generar sesgos al momento de distinguir *S. ruficollis* y *S. hypoxantha* (dos especies con patrones de coloración muy similares) sobre todo si los machos juveniles de *S. ruficollis* no han pigmentado del todo su garganta negra.

El tamaño de las muestras para las especies y poblaciones estuvo desbalanceado, lo que podría haber ocurrido principalmente porque la abundancia y el rango de distribución de las especies es variable: *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* generalmente son más abundantes y tienen una distribución más extensa que *S. iberaensis* y *S. palustris* (ver *ebird.com*). En este estudio, *S. hypoxantha* y *S.*

ruficollis concentraron aproximadamente el 89% de los cantos simples grabados, siendo *hypox-EI* y *rufi-ER* las dos poblaciones que contribuyeron con más grabaciones (27,3% y 17,9% respectivamente), sumando entre ambas cerca de la mitad de los cantos simples. En cambio, para el dataset de cantos complejos, *S. palustris* aportó alrededor del 44% del total de cantos. La proporción entre cantos simples y cantos complejos varió con la especie. Mientras que para *S. palustris* se registraron casi seis veces más cantos complejos que simples, para *S. ruficollis* esta proporción se invirtió y se grabaron alrededor de tres veces más cantos simples que complejos.

4.3.2. REDUCCIÓN DE LA DIMENSIONALIDAD Y ORDENAMIENTO DE LAS ESPECIES Y POBLACIONES EN EL ESPACIO ACÚSTICO

Para las variables acústicas estimadas por elemento se retuvieron los primeros tres ejes en el caso de los cantos simples (~70% de la varianza acumulada total) y los primeros cuatro ejes en el caso de los cantos complejos (~77% de la varianza acumulada total). Tanto para los cantos simples como para los cantos complejos, PC1 resumió información asociada con los rangos de frecuencia y las frecuencias máximas de los elementos. En cambio, PC2 se asoció fuertemente con variables temporales en cantos simples y con estimaciones de frecuencias mínimas en cantos complejos. PC3 también sintetizó información diferente según el tipo de canto, condensando variables que describieron la forma de los elementos en los cantos simples (*skew* y *kurt*) y variables temporales en cantos complejos. Finalmente, PC4 brindó información asociada la forma de los elementos (*skew* y *kurt*) para el dataset de cantos complejos (**Tabla 4.3**, **Tabla Suplementaria 4.4**).

Por otro lado, para los análisis de componentes principales realizados en función de las variables acústicas calculadas por canto se retuvieron los tres primeros ejes. Estos ejes resumieron aproximadamente el 75% de la varianza de los cantos simples y el 78% de la varianza de los cantos complejos. Para ambos tipos de cantos, PC1 resumió información de un conjunto heterogéneo de variables acústicas (variables temporales, de frecuencia y de diversidad de elementos), PC2 se vinculó con variables temporales (como la duración de los intervalos entre elementos y las tasas de canto) y PC3 con estimaciones de frecuencia (**Tabla 4.3**, **Tabla Suplementaria 4.5**).

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES POR ESPECIE

Al comparar las cuatro especies en base a los resultados de los análisis de componentes principales de las variables acústicas calculadas por canto y por elemento, se observó que, para cantos simples,

S. hypoxantha y *S. ruficollis* tuvieron una mayor variabilidad y un gran solapamiento en el espacio bidimensional (entre PC1 y PC2, y PC2 y PC3) tanto entre sí como con *S. palustris* y *S. iberaensis*. Por su parte, *S. palustris* y *S. iberaensis* se diferenciaron en PC2 por sus diferencias en las variables temporales, en donde *S. iberaensis* tendió a tener elementos más extensos, cantos más largos y tasas de canto menores que *S. palustris* (**Figura 4.4**). En el espacio de PC2 y PC3, *S. hypoxantha* y *S. palustris* tuvieron frecuencias mayores y rangos de frecuencia más amplios que *S. ruficollis* y *S. iberaesis*, mientras que estas últimas exhibieron un mayor número y una mayor diversidad de elementos (**Figura 4.4**). Para cantos complejos, solo fue posible distinguir a *S. palustris* en los análisis realizados a nivel de canto, ya que se diferenció del resto por sus elevadas tasas de canto; los patrones a nivel de elementos fueron sumamente complejos y con una superposición tal que no permiten sacar conclusiones (**Figura 4.5**).

Tabla 4.3: Resumen de la simplificación de variables en los Análisis de Componentes Principales para cada uno de los cuatro dataset de variables acústicas estimadas. Se indican los componentes principales (PCs) retenidos en cada caso luego de realizar pruebas gráficas tipo *screeplot*, el porcentaje de la varianza acumulada que explica cada PC y las variables acústicas que se correlacionaron sustancialmente con cada PC (variables con mayor "carga"; ver más detalle en la **Tabla Suplementaria 4.4**).

Dataset		Componente Principal	% de varianza acumulada explicada	Variables fuertemente correlacionadas
Estimación de la variable	Tipo de canto			
Por elemento	Simple	PC1	45%	Freq 95 Hz , PFC Max Freq Hz, Q1 Freq Hz, IQR BW Hz, BW 90 Hz , Peak Freq Hz , meanpeakf
		PC2	59%	Dur 90 s , time median, Delta Time s, time Q25, IQR Dur s
		PC3	70%	Skew, kurt, entropy, sfm
	Complejo	PC1	28%	Freq 95 Hz , BW 90 Hz , sd, freq IQR
		PC2	48%	Freq 5 Hz , Q1 Freq Hz , PFC Min Freq Hz
		PC3	67%	Delta Time s, Dur 90 s , time median, time Q25
		PC4	77%	Skew, kurt
Por canto	Simple	PC1	40%	Duración del canto, tasa de canto, mst, número de elementos, rango de frecuencia mínima 5% y máxima 95%
		PC2	59%	Duración de los intervalos
		PC3	75%	Meanpeakf
	Complejo	PC1	43%	*mst* , número de elementos, duración del canto, rango de frecuencia mínima 5% y máxima 95%
		PC2	67%	Tasa de canto, duración de los intervalos
		PC3	78%	Meanpeakf

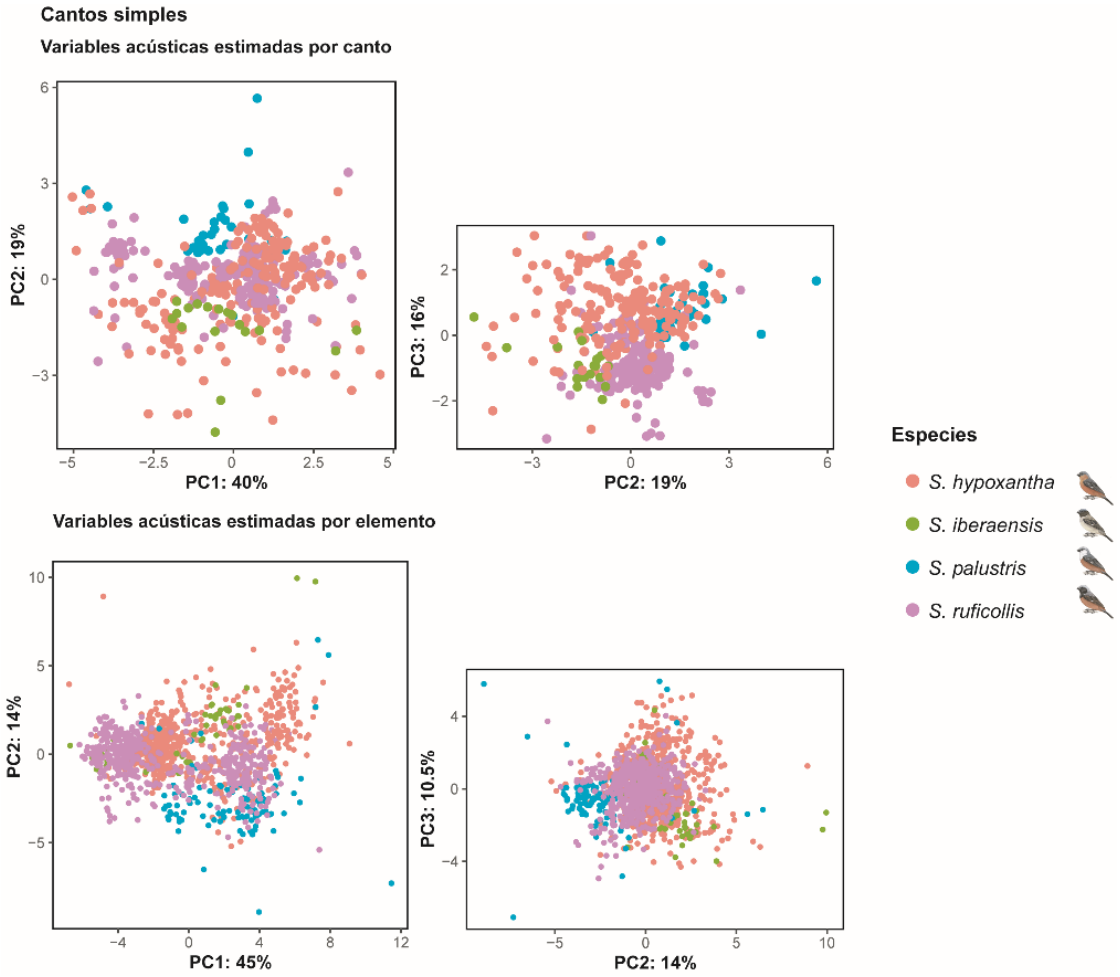


Figura 4.4: Representación gráfica de los espacios acústicos comprendidos entre los componentes principales retenidos para cantos simples. Se muestran los espacios construidos en base a variables acústicas estimadas por canto y a variables acústicas estimadas por elemento. Los distintos colores representan las cuatro especies focales de capuchinos del sur estudiadas en este capítulo (ver referencia a la derecha en la figura).

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES POR POBLACIÓN

La interpretación gráfica de los resultados al comparar las poblaciones se basó únicamente en las variables acústicas considerando los cantos, ya que a nivel poblacional no es posible distinguir un patrón en el espacio bidimensional cuando se grafican todos los elementos del set de datos. Los análisis mostraron algunos patrones interesantes de destacar (**Figura 4.6** y **Figura Suplementaria 4.7**). En primer lugar, para los cantos simples las poblaciones que vocalizan simpátricamente tendieron a hacerlo en subespacios distintos dentro del espacio bidimensional conformado por PC1 y PC2, mientras que los cantos de poblaciones alopátricas mostraron una mayor superposición. Por ejemplo, los cantos de *S. hypoxantha*, *S. iberaensis* y *S. palustris* de Esteros del Iberá (*hypox-EI*, *ibe-EI* y *pal-EI*) se distinguen entre sí en el espacio determinado por los PCs, mientras que la población

de *S. hypoxantha* de Entre Ríos (*hypox-ER*) mostró un solapamiento considerable con la de *S. iberaensis* de Iberá (una especie que no está presente en Entre Ríos). Por otro lado, y en relación con *S. ruficollis*, las vocalizaciones de Salta (*rufi-S*) se mantuvieron distantes de las del resto de las

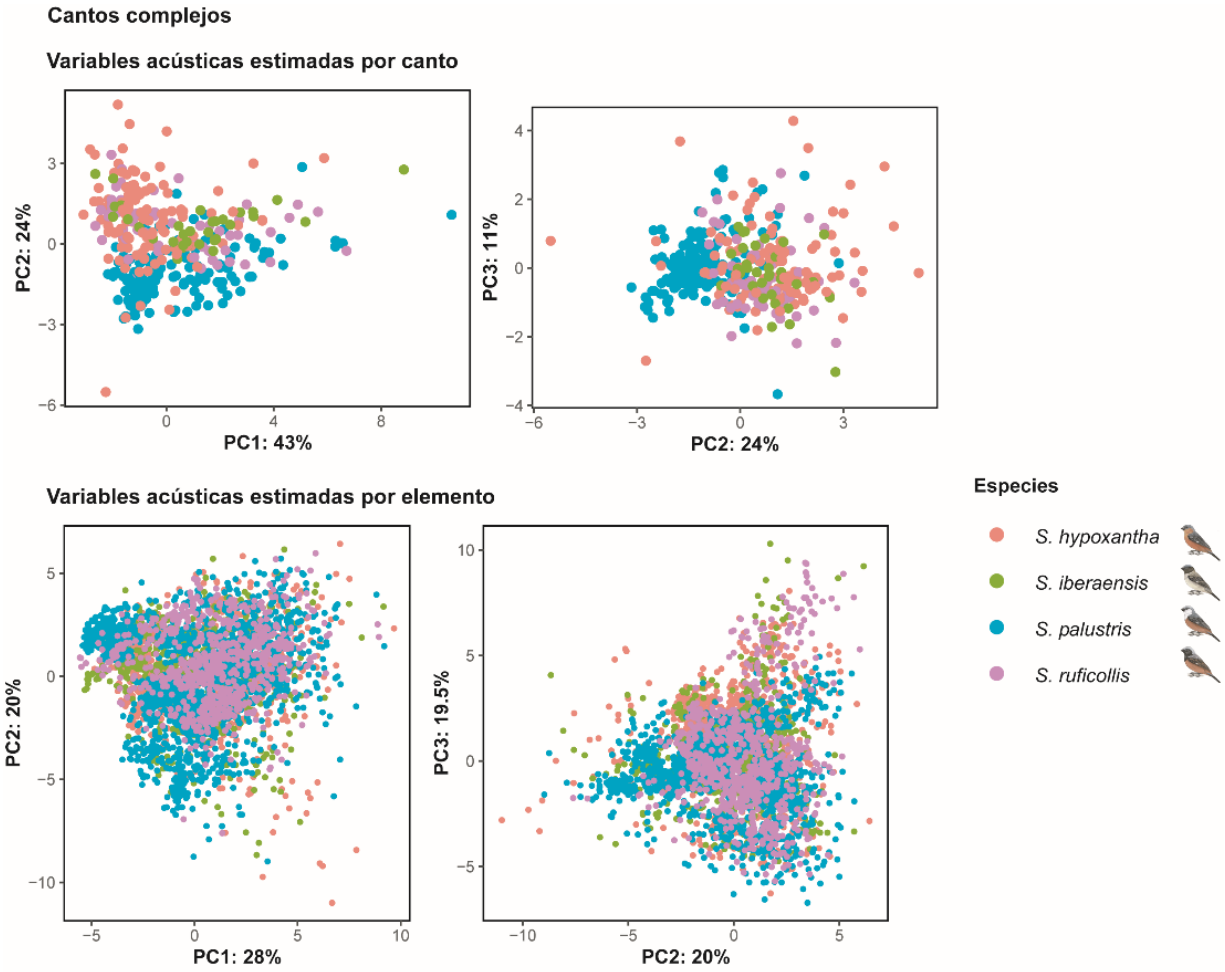


Figura 4.5: Representación gráfica de los espacios acústicos comprendidos entre los componentes principales retenidos para cantos complejos. Se muestran los espacios construidos en base a variables acústicas estimadas por canto y a variables acústicas estimadas por elemento. Otros detalles como en la **Figura 4.4**.

poblaciones examinadas (incluyendo otras poblaciones de la propia especie), difiriendo principalmente en variables acústicas temporales de sus cantos simples representadas por PC1. Esto es interesante, y en cierto modo esperable, dada la distancia geográfica que esta población del noroeste de Argentina tiene con respecto al resto de las poblaciones del grupo (tanto de su propia especie como del resto). En relación con *S. hypoxantha*, las poblaciones se diferenciaron, tanto en sus cantos simples como complejos, en un gradiente de valores crecientes de PC2, indicando rangos

de frecuencia y tasas de canto menores en la población de Mar Chiquita (*hypox-MC*), intermedios en Entre Ríos (*hypox-ER*) y mayores en Iberá (*hypox-EI*).

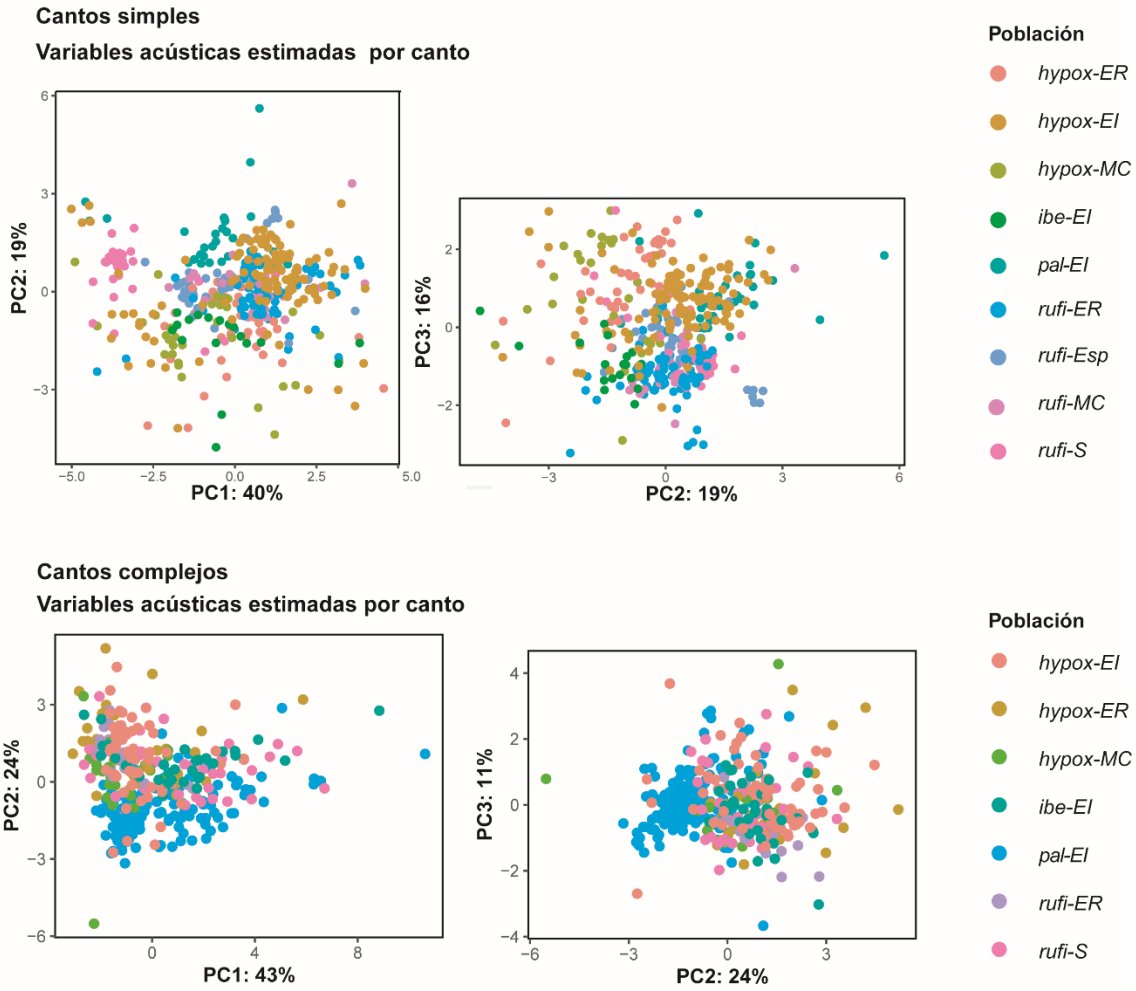


Figura 4.6: Representación gráfica de los espacios acústicos comprendidos entre los componentes principales retenidos para cantos simples y complejos. Se muestran los espacios construidos en base a variables acústicas estimadas por canción. Los distintos colores representan las poblaciones de capuchinos del sur estudiadas en este capítulo (ver leyenda referencial). Las abreviaturas para hacer referencia a las poblaciones se detallan en la **Sección 4.2.1**.

4.3.3. DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES EN LAS VARIABLES ACÚSTICAS

CANTOS SIMPLES

Para los cantos simples, las variables de frecuencia (PC1) y de duración de los elementos (PC2) difirieron significativamente en función de la especie de capuchino (p < 0,0001 en ambos casos; **Tabla 4.4**), mientras que el PC3 difirió con una significancia marginalmente significativa (p = 0,05). Las pruebas post-hoc de Tukey (ver **Tabla 4.4**) indicaron que cuatro de las seis comparaciones

posibles entre especies difirieron significativamente en su frecuencia, es decir en PC1. Notoriamente, *S. palustris* difirió significativamente de las otras tres especies, y también se diferenciaron *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* ($p < 0,05$ en todos los casos). Los pares de especies *S. iberaensis* vs. *S. ruficollis* y *S. iberaensis* vs. *S. hypoxantha* fueron los pares sin diferencias significativas ($p > 0,29$ en ambos contrastes). Similarmente, todos los contrastes de pares de especies mostraron diferencias significativas en la duración de los elementos (PC2) excepto el par *S. hypoxantha* vs *S. iberaensis* ($p = 0,39$). Las variables acústicas resumidas en el PC3 no difirieron significativamente entre las especies y solo mostraron valores marginalmente significativos para el par *S. hypoxantha* vs *S. iberaensis*, en donde los elementos de *S. hypoxantha* tendieron ser más asimétricos y a poseer menor entropía que los de *S. iberaensis* (además de la estadística reportada en la **Tabla 4.4,** se pueden ver estos resultados gráficamente en la **Figura 4.6**).

Por otro lado, en relación con las variables acústicas calculadas por canto se encontró que la duración de los cantos, el rango de frecuencias, y la diversidad de elementos de los cantos (variables resumidas en el PC1) difirieron marginalmente entre las especies ($p = 0,05$). En cambio, el intervalo de tiempo entre los elementos (PC2) y la frecuencia pico promedio (*meanpeakf*, PC3) variaron sustancialmente entre las especies de capuchinos estudiadas ($p < 0,001$ en ambos casos; **Tabla 4.4**). Las variables resumidas en PC1 difirieron significativamente para el par *S. hypoxantha* vs *S. palustris* ($p < 0,04$) y marginalmente para el par *S. ruficollis* vs *S. palustris* ($p = 0,05$), en donde *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* tuvieron un mayor rango de frecuencias, una mayor duración y una mayor diversidad de elementos en sus cantos simples que *S. palustris* (siendo este último un resultado que puede deberse, al menos parcialmente, al hecho de que *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* poseen una mayor distribución y más poblaciones muestreadas). La duración del intervalo entre los elementos (PC2) difirió significativamente entre todos los pares de especies, excepto para el par *S. palustris* vs *S. ruficollis* ($p = 0,99$). Por otro lado, la frecuencia pico promedio (*meanpeakf*, PC3) varió significativamente en cuatro de las seis comparaciones, siendo *S. hypoxantha* vs *S. palustris* y *S. iberaensis* vs *S. ruficollis* las que no presentaron diferencias (p entre 0,97 y 0,99; **Figura 4.6, Tabla 4.4**).

Tabla 4.4: Comparación de los componentes principales que resumen las variables acústicas por elementos y por cantos para los cantos simples entre los pares de especies de capuchinos. Contrastes pos-hoc de Tukey de pares de especies indicando la estimación de la diferencia estadística (Est.) entre las especies contrastadas para cada componente principal (PC), el error estándar de dicha estimación (SE) y la significancia estadística de la misma (*p*). Al final de la tabla se señala el valor de *p* global que arrojó el modelo en relación con el efecto de las especies sobre la variación de cada componente principal. El epíteto específico del nombre de las especies se encuentra abreviado. Los valores de $p \leq 0,05$ se resaltan en negrita y cursiva.

Contraste	Variables acústicas estimadas por elemento									Variables acústicas estimadas por canto								
	PC1			PC2			PC3			PC1			PC2			PC3		
	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*
S. hypox vs S. ibe	0,79	0,50	0,39	-0,94	0,59	0,39	1,11	0,44	0,06	0,78	0,73	0,71	17,08	0,48	***0,004***	1,69	0,37	***0,0001***
S. hypox vs S. pal	-1,84	0,29	***< 0,0001***	3,39	0,40	***< 0,0001***	0,59	0,31	0,25	1,46	0,53	***0,04***	-14,63	0,37	***0,001***	-0,07	0,29	0,99
S. hypox vs S. ruf	1,69	0,20	***< 0,0001***	1,51	0,33	***0,0001***	0,07	0,27	0,99	-0,31	0,46	0,91	-13,84	0,28	***< 0,0001***	1,53	0,19	***< 0,0001***
S. ibe vs S. pal	-2,64	0,55	***< 0,0001***	4,32	0,64	***< 0,0001***	-0,53	0,47	0,68	0,67	0,79	0,83	-31,71	0,54	***< 0,0001***	-1,76	0,43	***0,0005***
S. ibe vs S. ruf	0,90	0,51	0,29	2,45	0,66	***0,002***	-1,04	0,51	0,18	-1,10	0,85	0,57	-30,92	0,55	***< 0,0001***	-0,16	0,37	0,97
S. pal vs S. ruf	3,53	0,30	***< 0,0001***	-1,87	0,50	***0,002***	-0,51	0,41	0,59	-1,77	0,68	***0,05***	0,08	0,46	0,99	16	0,29	***< 0,0001***
valor global de p	***p < 0,0001***			***p < 0,0001***			***p = 0,05***			***p = 0,05***			***p < 0,0001***			***p < 0,0001***		

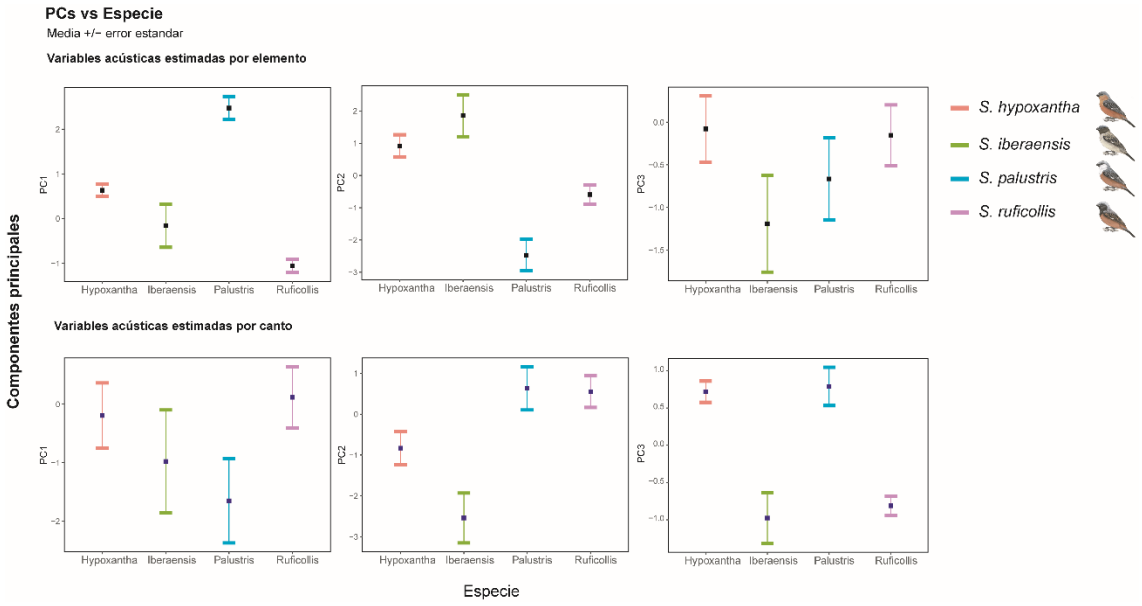


Figura 4.6: Variabilidad acústica por elemento y por canto en función de las especies, cantos simples. Se representan gráficamente la media (± SE) de *scores* para los componentes principales retenidos que se construyeron en base a las estimaciones de las variables acústicas de los cantos simples (calculadas por elemento y por canto) de las cuatro especies focales del capítulo. Los colores de las barras representan las distintas especies de capuchinos del sur analizadas (ver leyenda a la derecha de la figura).

CANTOS COMPLEJOS

Las variables de los cantos complejos calculadas sobre los elementos resumidas en los cuatro componentes principales difirieron entre las especies de capuchinos ($p < 0,04$ en todos los casos; **Tabla 4.5**). Las frecuencias máximas y los rangos de frecuencias de los elementos (PC1) se diferenciaron significativamente solo entre *S. palustris* y *S. ruficollis* (*S. palustris* mostró frecuencias

máximas y rangos de frecuencias marginalmente menores que *S. ruficollis*; p = 0,05). Del mismo modo, este par de especies se diferenció significativamente en las frecuencias mínimas de sus elementos (PC2; p < 0,001), al igual que el par *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* (p = 0,02). La duración de los elementos (PC3) difirió significativamente en cuatro de los seis contrastes entre pares de especies, difiriendo en particular entre *S. palustris* y las otras tres especies (p < 0,02 en todos los casos), así como entre *S. ibearaensis* y *S. ruficollis* (p = 0,004). No hubo diferencias en los pares *S. hypoxantha* vs *S. iberaensis* (diferenciación marginalmente significativa; p = 0,09) y *S. hypoxantha* vs *S. ruficollis* (p = 0,4). Finalmente, en relación con la forma de los elementos (PC4), *S. iberaensis* difirió significativamente de las otras tres especies (p < 0,004 en todos los casos), indicando que esta especie tiene elementos más simétricos y planos en comparación al resto de los capuchinos comparados (ninguna de las comparaciones entre las otras tres especies mostró diferencias significativas; **Figura 4.7**, **Tabla 4.5**).

Respecto a los parámetros acústicos estimados por canto, solo la tasa de canto y la duración de los elementos (PC2) difirieron significativamente en función de la especie (p < 0,0001; **Tabla 4.5**). Específicamente *S. palustris* fue la especie que mostró mayor divergencia, teniendo tasas de canto mayores e intervalos de tiempo inferiores en sus cantos complejos cuando se la comparó con el resto de los capuchinos (p < 0,0001 en todos los casos). Los demás capuchinos no difirieron entre sí en estas variables. A su vez, las especies comparadas no mostraron diferencias significativas ni para las variables de diversidad (PC1) y ni para las frecuencias pico promedio (*meanpeakf*; **Tabla 4.5**, **Figura 4.7**).

Tabla 4.5: Comparación de los componentes principales que resumen las variables acústicas elementales y por canto para los cantos complejos entre los pares de especies de capuchinos. Detalles como en la **Tabla 4.4**.

Contraste	Variables acústicas estimadas por elemento												Variables acústicas estimadas por canto								
	PC1			PC2			PC3			PC4			PC1			PC2			PC3		
	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	p	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*
S. hypox vs S. ibe	0,15	0,48	0,99	-0,09	0,21	0,97	0,72	0,30	0,09	0,76	0,20	***0,001***	-1,61	0,70	0,10	0,17	0,39	0,97	0,35	0,42	0,84
S. hypox vs S. pal	0,73	0,30	0,08	0,16	0,14	0,66	1,56	0,21	***<0,0001***	0,04	0,12	0,98	-0,68	0,40	0,33	2,06	0,25	***<0,0001***	0,13	0,25	0,95
S. hypox vs S. ruf	-0,13	0,34	0,98	-0,47	0,16	***0,02***	-0,56	0,36	0,40	0,02	0,14	0,99	-0,56	0,47	0,64	0,27	0,27	0,76	0,41	0,29	0,49
S. ibe vs S. pal	0,58	0,47	0,61	0,25	0,21	0,62	0,84	0,27	***0,01***	-0,72	0,20	***0,002***	0,93	0,70	0,54	1,89	0,37	***<0,0001***	-0,22	0,42	0,95
S. ibe vs S. ruf	-0,29	0,50	0,94	-0,38	0,22	0,33	-1,29	0,46	***0,03***	-0,74	0,21	***0,004***	1,06	0,74	0,48	0,10	0,39	0,99	0,06	0,44	0,99
S. pal vs S. ruf	-0,87	0,33	***0,05***	-0,63	0,16	***0,0007***	-2,13	0,41	***<0,0001***	-0,02	0,14	0,99	0,13	0,47	0,99	-1,79	0,25	***<0,0001***	0,27	0,28	0,76
valor global de p	***p = 0,03***			***p = 0,002***			***p = 0,03***			***p < 0,0001***			*p* = 0,09			***p < 0,0001***			*p* = 0,52		

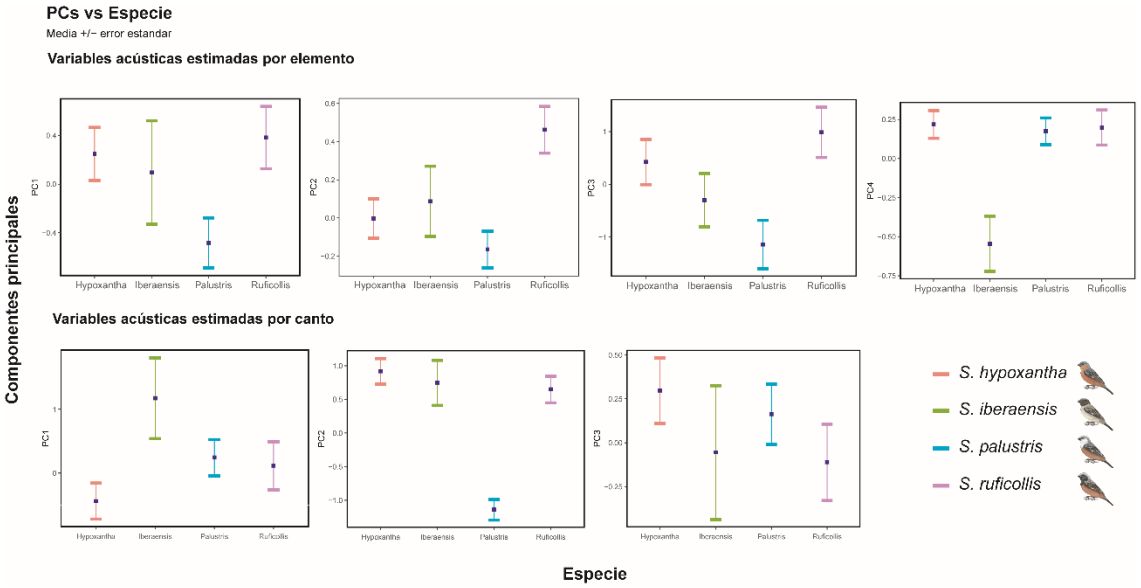


Figura 4.7: Variabilidad acústica por elemento y por canto en función de las especies, cantos complejos. Se representa gráficamente la media (± SE) de los *scores* para los componentes principales retenidos que se construyeron en base a las estimaciones de las variables acústicas de los cantos simples (calculadas por elemento y por canción) de las cuatro especies focales del capítulo. Otros detalles como en **Figura 4.6**.

4.3.4. DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES EN LAS VARIABLES ACÚSTICAS

CANTOS SIMPLES

Las variables acústicas de los cantos simples, tanto por elemento como por canto, variaron significativamente en sus primeros tres componentes principales en función de las poblaciones ($p <$ 0,0001 en todos los casos, **Tablas 4.6** y **4.7**). Las pruebas post-hoc de Tukey concordaron con algunos de los resultados reportados al explorar las variables en función de las especies, pero también ofrecieron nuevas perspectivas vinculadas específicamente con la variación de los cantos simples entre las poblaciones. En particular, gráficamente se había observado y reportado en la sección 4.3.2 que ciertos parámetros acústicos se encuentran diferenciados entre poblaciones simpátricas y no entre poblaciones alopátricas. La misma impresión se obtiene para varios de los PCs cuando se los compara gráficamente entre especies (**Figura 4.8**), pero los análisis estadísticos muestran diferencias significativas solamente para algunos de estos parámetros acústicos al comparar las poblaciones simpátricas (**Tablas 4.6** y **4.7**). A continuación, se detallan los resultados de estos análisis.

Así como en los análisis hechos en función de las especies *S. palustris* se había distinguido sustancialmente del resto de los capuchinos en el rango de frecuencia y las frecuencias máximas de

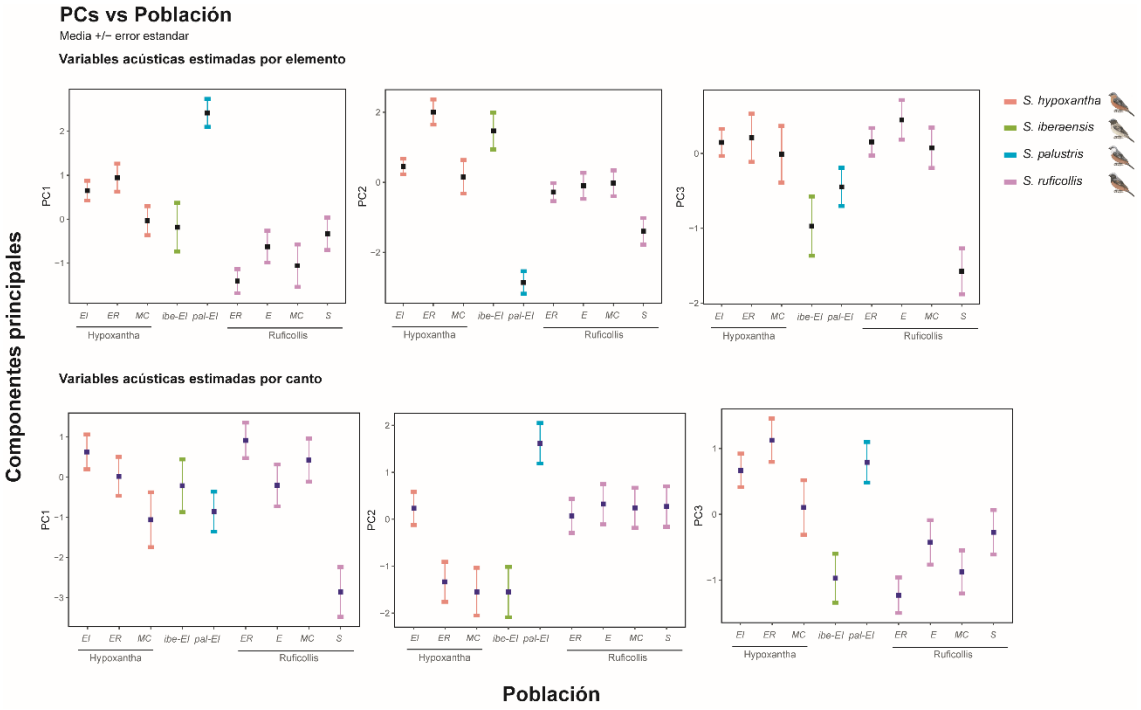
sus elementos (PC1), su única población en el set de datos (la de Iberá, *pal-EI*) fue la población que más se diferenció en el PC1 (ver **Figura 4.8**). De hecho, *pal-EI* estuvo presente en ocho de los 14 contrastes significativos para estas variables (**Tabla 4.6**).

Tabla 4.6: Comparación de los componentes principales que resumen las variables acústicas de los elementos para los cantos simples entre los pares de poblaciones de capuchinos del sur. Contrastes pos-hoc de Tukey de pares de especies indicando la estimación de la diferencia estadística (Est.) entre las especies contrastadas para cada componente principal (PC), el error estándar de dicha estimación (SE) y la significancia estadística de la misma (*p*). Al final de la tabla se señala el valor global de *p* que arrojó el modelo en relación con el efecto de las poblaciones sobre la variación de cada componente principal (ver modelos en **Tabla Suplementaria 4.2**). Las poblaciones se identifican con la abreviatura indicada en la Sección 4.2.1. Los valores significativos de *p* se resaltaron en negrita y cursiva.

CANTOS SIMPLES- Variables acústicas estimadas por elemento									
Contraste	**PC1**			**PC2**			**PC3**		
	Est.	**SE**	***p***	**Est.**	**SE**	***p***	**Est.**	**SE**	***p***
hypox-EI vs hypox-ER	-0,30	0,39	0,99	-1,56	0,42	***0,01***	-0,06	0,37	0,99
hypox-EI vs hypox-MC	0,68	0,40	0,74	0,29	0,53	0,99	0,16	0,42	0,99
hypox-EI vs ibe-EI	0,83	0,60	0,90	-1,01	0,57	0,69	1,12	0,44	0,22
hypox-EI vs pal-EI	-1,77	0,39	***0,0007***	3,31	0,39	***< 0,0001***	0,59	0,31	0,61
hypox-EI vs rufi-ER	2,06	0,35	***< 0,0001***	0,73	0,34	0,44	-0,01	0,26	0,99
hypox-EI vs rufi-Esp	1,28	0,43	0,09	0,55	0,43	0,94	-0,30	0,32	0,99
hypox-EI vs rufi-MC	1,71	0,53	***0,0483***	0,48	0,43	0,97	0,07	0,32	0,99
hypox-EI vs rufi-S	0,98	0,43	0,36	1,85	0,44	***0,003***	1,72	0,36	***0,0002***
hypox-ER vs hypox-MC	0,98	0,46	0,46	1,85	0,60	0,07	0,22	0,50	0,99
hypox-ER vs ibe-EI	1,13	0,64	0,70	0,54	0,64	0,99	1,18	0,51	0,35
hypox-ER vs pal-EI	-1,48	0,45	***0,0417***	4,87	0,48	***< 0,0001***	0,66	0,41	0,80
hypox-ER vs rufi-ER	2,36	0,42	***< 0,0001***	2,29	0,44	***0,0001***	0,05	0,37	0,99
hypox-ER vs rufi-Esp	1,57	0,49	***0,045***	2,11	0,52	***0,004***	-0,24	0,42	0,99
hypox-ER vs rufi-MC	2,00	0,58	***0,0242***	2,03	0,52	***0,006***	0,13	0,42	0,99
hypox-ER vs rufi-S	1,28	0,49	0,20	3,41	0,53	***< 0,0001***	1,78	0,44	***0,0044***
hypox-MC vs ibe-EI	0,15	0,64	0,99	-1,31	0,71	0,6565	0,96	0,55	0,71
hypox-MC vs pal-EI	-2,45	0,46	***< 0,0001***	3,02	0,58	***0,0001***	0,44	0,46	0,99
hypox-MC vs rufi-ER	1,38	0,43	***0,0484***	0,44	0,54	0,99	-0,17	0,42	0,99
hypox-MC vs rufi-Esp	0,59	0,49	0,95	0,26	0,61	0,99	-0,46	0,46	0,99
hypox-MC vs rufi-MC	1,03	0,58	0,71	0,18	0,61	0,99	-0,09	0,47	0,99
hypox-MC vs rufi-S	0,30	0,49	0,99	1,56	0,61	0,23	1,56	0,49	***0,05***
ibe-EI vs pal-EI	-2,60	0,64	***0,0035***	4,33	0,62	***< 0,0001***	-0,52	0,47	0,97
ibe-EI vs rufi-ER	1,23	0,62	0,55	1,75	0,58	0,09	-1,13	0,44	0,21
ibe-EI vs rufi-Esp	0,44	0,66	0,99	1,57	0,64	0,28	-1,42	0,48	0,09
ibe-EI vs rufi-MC	0,88	0,73	0,96	1,49	0,64	0,34	-1,05	0,48	0,42
ibe-EI vs rufi-S	0,15	0,66	0,99	2,87	0,65	***0,0012***	0,60	0,50	0,95
pal-EI vs rufi-ER	3,83	0,42	***< 0,0001***	-2,58	0,41	***< 0,0001***	-0,60	0,32	0,61
pal-EI vs rufi-Esp	3,05	0,48	***< 0,0001***	-2,76	0,49	***< 0,0001***	-0,90	0,37	0,28
pal-EI vs rufi-MC	3,48	0,58	***< 0,0001***	-2,83	0,49	***< 0,0001***	-0,52	0,37	0,89
pal-EI vs rufi-S	2,76	0,49	***< 0,0001***	-1,46	0,50	0,10	1,13	0,40	0,13
rufi-ER vs rufi-Esp	-0,79	0,46	0,73	-0,18	0,45	0,99	-0,29	0,32	0,99
rufi-ER vs rufi-MC	-0,35	0,56	0,99	-0,25	0,45	0,99	0,08	0,33	0,99
rufi-ER vs rufi-S	-1,08	0,46	0,33	1,12	0,46	0,29	1,73	0,36	***0,0003***
rufi-Esp vs rufi-MC	0,43	0,60	0,99	-0,08	0,52	0,99	0,37	0,38	0,99
rufi-Esp vs rufi-S	-0,29	0,52	0,99	1,30	0,53	0,28	2,02	0,41	***0,0001***
rufi-MC vs rufi-S	-0,73	0,61	0,95	1,37	0,53	0,21	1,65	0,41	***0,004***
valor globlal de p	***p < 0,0001***			***p < 0,0001***			***p = 0,0001***		

Tabla 4.7: Comparación de los componentes principales que resumen las variables acústicas por canto para los cantos simples entre los pares de poblaciones de capuchinos del sur. Contrastes pos-hoc de Tukey de pares de especies indicando la estimación de la diferencia estadística (Est.) entre las especies contrastadas para cada componente principal (PC), el error estándar de dicha estimación (SE) y la significancia estadística de la misma (*p*). Al final de la tabla se señala el valor global de *p* que arrojó el modelo en relación con el efecto de las poblaciones sobre la variación de cada componente principal (ver modelos en **Tabla Suplementaria 4.2**). Otros detalles como en la **Tabla 4.6**.

CANTOS SIMPLES- Variables acústicas estimadas por canto									
Contraste	**PC1**			**PC2**			**PC3**		
	Est.	**SE**	***p***	**Est.**	**SE**	***p***	**Est.**	**SE**	***p***
hypox-EI vs hypox-ER	-0,61	0,65	0,99	-1,57	0,55	0,13	0,46	0,42	0,97
hypox-EI vs hypox-MC	1,69	0,81	0,49	1,78	0,62	0,12	0,57	0,49	0,96
hypox-EI vs ibe-EI	0,84	0,64	0,92	1,78	0,50	***0,02***	1,64	0,37	***0,0009***
hypox-EI vs pal-EI	1,49	0,48	0,06	-1,39	0,39	***0,02***	-0,12	0,30	0,99
hypox-EI vs rufi-E	0,83	0,68	0,89	-0,09	0,56	0,99	1,10	0,42	0,47
hypox-EI vs rufi-ER	-0,29	0,62	0,99	0,16	0,51	0,99	1,90	0,37	***0,0001***
hypox-EI vs rufi-MC	0,21	0,69	0,99	-0,01	0,56	0,99	1,55	0,41	***0,01***
hypox-EI vs rufi-S	3,49	0,76	***0,0006***	-0,04	0,56	0,99	0,94	0,42	0,40
hypox-ER vs hypox-MC	1,08	0,84	0,93	0,21	0,66	0,99	1,02	0,53	0,59
hypox-ER vs ibe-EI	0,23	0,82	0,99	0,22	0,69	0,99	2,10	0,50	***0,002***
hypox-ER vs pal-EI	0,88	0,70	0,94	-2,95	0,61	***0,0002***	0,34	0,45	0,99
hypox-ER vs rufi-E	0,23	0,71	1,00	-1,66	0,61	0,44	1,55	0,47	0,34
hypox-ER vs rufi-ER	-0,89	0,47	0,62	-1,40	0,39	***0,02***	2,36	0,33	***< 0,0001***
hypox-ER vs rufi-MC	-0,40	0,72	1,00	-1,58	0,60	0,2	2,00	0,47	***0,002***
hypox-ER vs rufi-S	2,88	0,79	***0,014***	-1,60	0,61	0,19	1,40	0,47	0,09
hypox-MC vs ibe-EI	-0,85	0,95	0,99	0,01	0,74	0,99	1,08	0,56	0,60
hypox-MC vs pal-EI	-0,20	0,85	0,99	-3,16	0,67	***0,0004***	-0,69	0,52	0,92
hypox-MC vs rufi-E	-0,86	0,86	0,95	-1,87	0,67	0,43	0,53	0,54	0,95
hypox-MC vs rufi-ER	-1,98	0,81	0,29	-1,62	0,63	0,22	1,33	0,49	0,17
hypox-MC vs rufi-MC	-1,48	0,74	0,55	-1,79	0,53	***0,03***	0,98	0,46	0,45
hypox-MC vs rufi-S	1,80	0,80	0,39	-1,81	0,53	***0,03***	0,38	0,47	0,99
ibe-EI vs pal-EI	0,65	0,69	0,99	-3,17	0,56	***< 0,0001***	-1,76	0,41	***0,002***
ibe-EI vs rufi-E	-0,01	0,84	0,99	-1,87	0,69	0,44	-0,54	0,50	0,93
ibe-EI vs rufi-ER	-1,13	0,79	0,88	-1,62	0,65	0,25	0,26	0,46	0,99
ibe-EI vs rufi-MC	-0,64	0,85	0,99	-1,79	0,69	0,20	-0,10	0,50	0,99
ibe-EI vs rufi-S	2,65	0,90	0,10	-1,82	0,69	0,19	-0,70	0,50	0,8984
pal-EI vs rufi-E	-0,66	0,72	0,97	1,30	0,61	0,60	1,22	0,46	0,46
pal-EI vs rufi-ER	-1,77	0,67	0,18	1,55	0,57	0,15	2,02	0,41	***0,0002***
pal-EI vs rufi-MC	-1,28	0,73	0,71	1,38	0,61	0,38	1,67	0,45	***0,012***
pal-EI vs rufi-S	2,00	0,80	0,24	1,35	0,61	0,41	1,06	0,46	0,35
rufi-E vs rufi-MC	-0,63	0,75	0,98	0,08	0,61	0,99	0,45	0,47	0,96
rufi-E vs rufi-S	2,66	0,81	0,34	0,05	0,61	0,99	-0,15	0,48	0,99
rufi-ER vs rufi-E	1,12	0,68	0,76	-0,25	0,56	0,99	-0,80	0,43	0,69
rufi-ER vs rufi-MC	0,49	0,70	0,99	-0,17	0,56	0,99	-0,35	0,42	0,99
rufi-ER vs rufi-S	3,77	0,76	***0,0002***	-0,20	0,56	0,99	-0,96	0,43	0,41
rufi-MC vs rufi-S	3,28	0,68	***0,0003***	-0,03	0,45	0,99	-0,60	0,39	0,83
valor globlal de p	***p < 0,0001***			***p < 0,0001***			***p < 0,0001***		



<u>Figura 4.8</u>: Variabilidad acústica por elemento y por canto en función de las poblaciones, cantos simples. Representación gráfica de la media (± SE) de los *scores* para los componentes principales retenidos construidos en base a las estimaciones de las variables acústicas de los cantos simples (calculadas por elemento y por canto) de las poblaciones estudiadas en el capítulo. Los distintos colores de las barras representan las especies a la que pertenecen las poblaciones analizadas (ver leyenda a la derecha de la figura). Para mayor claridad en los gráficos se indican las poblaciones de *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* con las iniciales de la localidad a la que pertenecen. El resto de las poblaciones se señalan de acuerdo con el criterio descripto en la Sección 4.2.1.

En relación con la duración de los elementos (PC2), la población de Entre Ríos de *S. hypoxantha* (*hypox-ER)*, la de *S. palustris* de Iberá (*pal-EI*) y la de Salta de *S. ruficollis* (*rufi-S*) fueron las tres poblaciones que mostraron mayor divergencia con respecto al resto (ver **Figura 4.8**). De hecho, al menos una de estas tres especies estuvo presente en todos los contrastes de pares de poblaciones que fueron estadísticamente significativos (**Tabla 4.6**). Si se analiza la variación de este factor (PC2) enfocándose en lo que ocurre entre poblaciones simpátricas y alopátricas se puede ver gráficamente que hay una tendencia a una mayor diferenciación entre las primeras. De hecho, dentro de Esteros del Iberá las poblaciones simpátricas de S. *hypoxanta* (*hypox-EI*), *S. iberaenis* (*ibe-EI*) y S. *palusris* (*pal –EI*) no se solaparon, mientras que en algunos casos las mismas poblaciones sí se solaparon con poblaciones de otras regiones de las mismas especies (por ejemplo, *ibe-EI* mostró valores similares a *hypox-ER*, es decir la población de *S. hypoxantha* de Entre Ríos, que es alopátrica; **ver Figura 4.8**). De la misma manera, se puede observar que las poblaciones de *S. hypoxantha* y *S.*

ruficollis en Entre Ríos (*hypox-ER* y *rufi-ER*) se diferenciaron sustancialmente en sus variables temporales, pero que *rufi-ER* pareció compartir valores temporales similares con otras poblaciones alopátricas de *S. hypoxantha* (*hypox-EI* e *hypox-MC*, **Figura 4.8**). Estas aproximaciones gráficas de los resultados, sin embargo, no estuvieron en todos los casos respaldadas estadísticamente por las pruebas post-hoc de Tukey (**Tabla 4.6**).

Por último, para las variables vinculadas con la forma de los elementos (PC3) las poblaciones mostraron una gran superposición, diferenciándose con claridad solo la población de Salta de *S. ruficollis* (*rufi-S*) y, en menor medida, la población de Iberá de *S. iberaensis (ibe-EI*; **Figura 4.8**). Consistentemente, todos los contrastes de pares de poblaciones que mostraron diferencias significativas entre poblaciones (seis de 36 contrastes totales) incluyeron a *rufi-S* como una de las dos poblaciones comparadas (**Tabla 4.6**).

Las variables estimadas por canto vinculadas con la duración, la diversidad y los rangos de frecuencia de los cantos simples condensadas en PC1 solo difirieron gráfica y estadísticamente en torno a *rufi-S* (presente en los cuatro contrastes de pares de poblaciones con diferencias significativas para PC1; **Figura 4.8, Tabla 4.7**). Por otro lado, la duración de los intervalos entre los elementos (PC2) difirió entre las poblaciones de *S. ruficollis* y *S. hypoxantha*, siendo la única excepción la población de Iberá de *S. hypoxantha* (*hypox-EI*), que es sugestivamente la única población de la especie en este análisis que no se reproduce en simpatría con *S. ruficollis*. Asimismo, para PC2 también se diferenciaron gráfica y estadísticamente las poblaciones simpátricas de Esteros del Iberá, Entre Ríos y Mar Chiquita. Por último, la frecuencia pico promedio (PC3) se diferenció sustancialmente entre las poblaciones simpátricas de Entre Ríos (*hypox-ER* y *rufi-ER*, $p < 0{,}0001$) y fue significativamente menor para *ibe-EI* que para a *hypox-EI* y *pal-EI* en Esteros del Iberá ($p < 0{,}002$ en ambos casos, **Figura 4.8, Tabla 4.7**).

CANTOS COMPLEJOS

Las variables acústicas de los cantos complejos estimadas a partir tanto de los elementos como de los cantos difirieron significativamente entre las poblaciones ($p < 0{,}01$), siendo la única excepción el PC3 ($p = 0{,}37$; **Tablas 4.8** y **4.9**). Sin embargo, en contraposición con los cantos simples, solamente unas pocas comparaciones entre poblaciones mostraron diferencias significativas, que de hecho exhibieron un mayor solapamiento de las variables acústicas y patrones más sutiles de

diferenciación, siendo esto notorio en particular al comparar las poblaciones simpátricas (**Figura 4.9**, **Tablas 4.8** y **4.9)**.

Al analizar los parámetros acústicos estimados a partir de los elementos, tanto la frecuencia máxima y el rango de frecuencias (PC1) como la frecuencia mínima (PC2) tuvieron valores similares entre las poblaciones estudiadas, diferenciándose fundamentalmente la población de *S. ruficollis* de Salta *(rufi-S*; **Figura 4.9**). Estadísticamente, *rufi-S* se diferenció significativamente en PC1 de la población de Iberá de *S. palustris* (*pal-EI*; $p < 0{,}005$) y en PC2 de las poblaciones de Iberá de *S. hypoxantha* y *S. palustris* (*hypox-EI* e *pal-EI*; $p = 0{,}001$ en ambos casos, **Tabla 4.8**).

Las variables temporales de los elementos (PC3) fueron las que más variaron entre las poblaciones (ver **Figura 4.9**), y de hecho casi la mitad de las comparaciones entre poblaciones mostraron diferencias significativas (9 de 21 comparaciones; **Tabla 4.8**). Esto muestra la notoria variación en las características temporales de las vocalizaciones complejas, tanto entre especies como dentro de las poblaciones. Sin embargo, no se encontró un patrón claro en el que dicha variación se diera principalmente entre alguna de las poblaciones y el resto o entre aquellas que se encuentran en simpatría (como sí había ocurrido con los cantos simples).

Tabla 4.8: Comparación de los componentes principales por elemento para los cantos complejos entre los pares de poblaciones de capuchinos del sur. Contrastes pos-hoc de Tukey de pares de especies indicando la estimación de la diferencia estadística (Est.) entre las especies contrastadas para cada componente principal (PC), el error estándar de dicha estimación (SE) y la significancia estadística de la misma (*p*). Al final de la tabla se señala el valor global de *p* que arrojó el modelo en relación con el efecto de las poblaciones sobre la variación de cada componente principal (ver modelos en **Tabla Suplementaria 4.2**). Otros detalles como en la **Tabla 4.6**.

CANTOS COMPLEJOS- Variables acústicas estimadas por elemento												
Contraste	PC1			PC2			PC3			PC4		
	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*	Est.	SE	*p*
hypox-EI vs hypox-ER	-0,23	0,45	0,99	-0,40	0,22	0,50	0,03	0,28	0,99	0,19	0,19	0,95
hypox-EI vs hypox-MC	0,53	0,75	0,99	-0,21	0,32	0,99	0,81	0,42	0,47	-0,26	0,30	0,97
hypox-EI vs ibe-EI	0,12	0,51	0,99	-0,27	0,22	0,88	0,75	0,30	0,18	0,81	0,21	***0,004***
hypox-EI vs pal-EI	0,69	0,36	0,48	-0,02	0,17	0,99	1,60	0,21	***<0,0001***	0,10	0,15	0,99
hypox-EI vs rufi-ER	0,67	0,54	0,88	-0,21	0,25	0,98	-0,72	0,36	0,42	-0,08	0,22	0,99
hypox-EI vs rufi-S	-0,75	0,44	0,62	-0,84	0,20	***0,001***	1,07	0,28	***0,005***	0,15	0,18	0,98
hypox-ER vs hypox-MC	0,76	0,76	0,95	0,19	0,33	0,99	0,78	0,43	0,55	-0,46	0,31	0,75
hypox-ER vs ibe-EI	0,34	0,53	0,99	0,13	0,24	0,99	0,72	0,32	0,28	0,62	0,23	0,10
hypox-ER vs pal-EI	0,92	0,38	0,22	0,39	0,19	0,40	1,56	0,24	***<0,0001***	-0,10	0,17	0,99
hypox-ER vs rufi-ER	0,89	0,55	0,67	0,20	0,26	0,99	-0,75	0,37	0,42	-0,27	0,23	0,91
hypox-ER vs rufi-S	-0,52	0,46	0,91	-0,44	0,22	0,41	1,03	0,30	***0,0133***	-0,04	0,20	0,99
hypox-MC vs ibe-EI	-0,42	0,80	0,99	-0,06	0,33	0,99	-0,06	0,45	0,99	1,08	0,32	***0,02***
hypox-MC vs pal-EI	0,16	0,72	0,99	0,19	0,30	0,995	0,78	0,39	0,43	0,36	0,28	0,86
hypox-MC vs rufi-ER	0,14	0,82	0,99	0,01	0,35	0,99	-1,53	0,49	***0,04***	0,19	0,33	0,99
hypox-MC vs rufi-S	-1,28	0,76	0,62	-0,63	0,31	0,42	0,26	0,43	0,99	0,42	0,30	0,81
ibe-EI vs pal-EI	0,58	0,46	0,87	0,26	0,20	0,85	0,84	0,27	***0,04***	-0,72	0,19	***0,01***
ibe-EI vs rufi-ER	0,55	0,61	0,97	0,07	0,27	0,99	-1,47	0,39	***0,006***	-0,89	0,25	***0,01***
ibe-EI vs rufi-S	-0,86	0,52	0,64	-0,57	0,22	0,16	0,31	0,32	0,96	-0,66	0,22	0,06
pal-EI vs rufi-ER	-0,02	0,49	0,99	-0,19	0,22	0,98	-2,32	0,33	***<0,0001***	-0,17	0,20	0,98
pal-EI vs rufi-S	-1,44	0,38	***0,005***	-0,82	0,17	***0,0001***	-0,53	0,24	0,28	0,06	0,16	0,99
rufi-ER vs rufi-S	-1,42	0,55	0,14	-0,64	0,25	0,15	1,79	0,37	***0,0002***	0,23	0,23	0,95
valor globlal de p	***p = 0,009***			***p = 0,0004***			***p < 0,0001***			***p = 0,005***		

Tabla 4.9: Comparación de los componentes principales por canto para los cantos complejos entre los pares de poblaciones de capuchinos del sur. Contrastes pos-hoc de Tukey de pares de especies indicando la estimación de la diferencia estadística (Est.) entre las especies contrastadas para cada componente principal (PC), el error estándar de dicha estimación (SE) y la significancia estadística de la misma (*p*). Al final de la tabla se señala el valor global de *p* que arrojó el modelo en relación con el efecto de las poblaciones sobre la variación de cada componente principal (ver modelos en **Tabla Suplementaria 4.2**). Otros detalles como en la **Tabla 4.6**.

CANTOS COMPLEJOS- Variables acústicas estimadas por canto									
Contraste	**PC1**			**PC2**			**PC3**		
	Est.	**SE**	***p***	**Est.**	**SE**	***p***	**Est.**	**SE**	***p***
hypox-EI vs hypox-ER	-0,24	0,57	0,99	-0,64	0,40	0,68	0,35	0,39	0,97
hypox-EI vs hypox-MC	0,83	0,90	0,97	0,42	0,68	0,99	0,17	0,68	0,99
hypox-EI vs ibe-EI	-1,64	0,69	0,22	-0,02	0,44	0,99	0,51	0,47	0,93
hypox-EI vs pal-EI	-0,73	0,45	0,65	1,86	0,31	***<0,0001***	0,29	0,32	0,97
hypox-EI vs rufi-ER	0,64	0,59	0,93	-0,18	0,42	0,99	1,02	0,41	0,19
hypox-EI vs rufi-S	-1,46	0,59	0,19	0,25	0,37	0,99	0,23	0,39	0,99
hypox-ER vs hypox-MC	1,07	0,93	0,91	1,06	0,69	0,72	-0,18	0,69	0,99
hypox-ER vs ibe-EI	-1,40	0,74	0,48	0,62	0,45	0,82	0,16	0,49	0,99
hypox-ER vs pal-EI	-0,49	0,51	0,96	2,50	0,33	***<0,0001***	-0,05	0,34	0,99
hypox-ER vs rufi-ER	0,88	0,64	0,81	0,46	0,44	0,94	0,67	0,43	0,72
hypox-ER vs rufi-S	-1,22	0,64	0,49	0,89	0,39	0,27	-0,12	0,41	0,99
hypox-MC vs ibe-EI	-2,47	1,01	0,20	-0,44	0,72	0,99	0,34	0,74	0,99
hypox-MC vs pal-EI	-1,56	0,87	0,55	1,44	0,65	0,29	0,12	0,65	0,99
hypox-MC vs rufi-ER	-0,19	0,94	0,99	-0,60	0,71	0,98	0,85	0,71	0,89
hypox-MC vs rufi-S	-2,28	0,95	0,21	-0,17	0,68	0,99	0,06	0,69	0,99
ibe-EI vs pal-EI	0,91	0,65	0,80	1,88	0,38	***0,0001***	-0,22	0,42	0,99
ibe-EI vs rufi-ER	2,28	0,75	***0,05***	-0,16	0,47	0,99	0,51	0,50	0,95
ibe-EI vs rufi-S	0,19	0,76	0,99	0,27	0,43	0,99	-0,28	0,48	0,99
pal-EI vs rufi-ER	1,37	0,53	0,15	-2,04	0,36	***<0,0001***	0,73	0,37	0,43
pal-EI vs rufi-S	-0,72	0,54	0,83	-1,61	0,30	***<0,0001***	-0,06	0,34	0,99
rufi-ER vs rufi-S	-2,09	0,66	***0,04***	0,43	0,42	0,95	-0,79	0,43	0,54
valor globlal de p	***p = 0,007***			***p < 0,0001***			***p* = 0,37**		

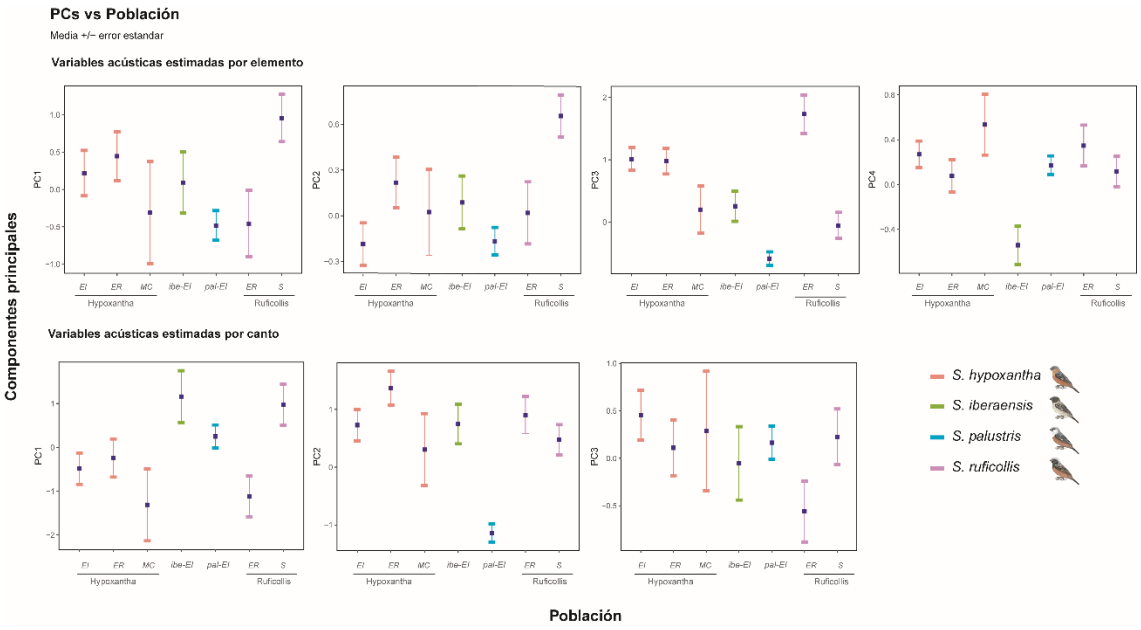


Figura 4.9: Variabilidad acústica por elemento y por canto en función de las poblaciones, cantos complejos. Representación gráfica de la media (± SE) de los *scores* para los componentes principales retenidos construidos en base a las estimaciones de las variables acústicas de los cantos complejos (calculadas por elemento y por canto) de las poblaciones estudiadas en el capítulo. Otros detalles como en la **Figura 4.8**.

Finalmente, tal como revelaron los análisis basados en las especies (**Sección 4.3.3**), en los que *S. iberaensis* había sido la que se había diferenciado del resto en la forma de los elementos de sus cantos complejos, en este análisis su única población (de Iberá, *ibe-EI*) fue la que se diferenció de las demás poblaciones en la forma de los elementos (PC4; esta población estuvo presente en los cuatro contrastes significativos del análisis de este componente; **Figura 4.9, Tabla 4.8**).

Así como ocurrió con los cantos simples, las variables estimadas por cantos (en vez de hacerlo por elementos individuales de los mismos) mostraron mucha menos diferenciación y por consiguiente muy pocas diferencias significativas entre las poblaciones (**Figura 4.9**, **Tabla 4.9**). El conjunto diverso de variables acústicas estimadas resumidas en PC1 (*mst*, número de elementos, duración del canto, rangos de frecuencia) fue similar entre todas las poblaciones, distinguiendo únicamente de manera significativa a la población de *S. ruficollis* de Entre Ríos (*ruf-ER*) de la de Salta (*ruf-S; p* = 0,04) y de la de *S. iberaensis* de Iberá (*ibe-EI*; *p* = 0,05).

En el caso del PC2, que indica diferencias en la tasa de canto y la duración de los intervalos se puede ver claramente la diferenciación de la población de *S. palustris* de Iberá (*pal-EI*) con respecto al resto, lo que es muy claro gráficamente (**Figura 4.9**) y estadísticamente (**Tabla 4.9**; los cinco contrastes con diferencias significativas incluyen a esta población).

Finalmente, las poblaciones no variaron estadísticamente en sus frecuencias pico promedio (*meanpeakf*, PC3; **Tabla 4.9**), aunque mostraron cierta diferenciación entre las poblaciones de *S. ruficollis* (**Figura 4.9**).

4.3.5. VARIABLES ACÚSTICAS Y DISTANCIA GEOGRÁFICA

Para analizar si la distancia geográfica entre los individuos incide sobre la diferenciación de sus vocalizaciones, se realizaron pruebas de Mantel que contrastaron matrices de distancia geográfica con matrices de distancia en los componentes principales de las propiedades acústicas de los cantos (**Tabla 4.10**). Para cantos simples estas pruebas mostraron que ni los cantos simples de *S. iberaensis* ni los de *S. palustris* (dos poblaciones cuyos individuos fueron muestreados en una misma localidad) parecen diferir con la distancia geográfica entre los individuos de la población. En cambio, *S. hypoxantha* (cuyas grabaciones incluyen tres localidades diferentes) mostró pequeños cambios en los componentes principales vinculados con variables integrales y variables temporales del canto

(PC1 y PC2) que se asociaron significativamente con la distancia entre los individuos (r = 0,07, p = 0,01 para PC1 y r = 0,3, p = 0,0001). *S. ruficollis*, por su parte, es la especie con mayores distancias geográficas entre las poblaciones consideradas en esta tesis, ya que incluye la población de Salta en el noroeste argentino, claramente la más alejada de las otras poblaciones de la especie en el centro y este de Argentina. Los análisis de *S. ruficollis* que incluyeron a la población de Salta mostraron que los individuos tienden a diferir considerablemente en variables integrales del canto (sintetizadas en PC1) cuando aumenta la distancia entre ellos (r = 0,5, p = 0,0001), mientras que las pruebas que excluyeron a la población de Salta mostraron que con la distancia entre los individuos hay pequeñas variaciones en las variables integrales y de frecuencia (r = 0,07, p = 0,002 para PC1 y r = 0,12, p = 0,0001 para PC3).

Para los cantos complejos solo *S. ruficollis* y *S. iberaensis* mostraron cambios en las propiedades acústicas de los cantos vinculadas con la distancia interindividual. Sorpresivamente, *S. iberaensis* mostró variabilidad intrapoblacional en sus cantos complejos, poseyendo cambios en propiedades acústicas integrales y en variables de frecuencia que estuvieron asociados con la distancia interindividual (r = 0,13, p = 0,03 para PC1 y r = 0,17, p = 0,006). Por otro lado, para *S. ruficollis* hubo una asociación significativa con la distancia únicamente cuando se excluyó la población de Salta, siendo la misma en las propiedades temporales del canto (PC2; r = 0,25, p = 0,02).

Tabla 4.10: Variación acústica de las especies en función de la distancia geográfica interindividual. Resultados de las pruebas de Mantel que correlacionaron las distancias geográficas con las distancias euclídeas para las variables acústicas de los cantos simples y complejos (sintetizadas en los componentes principales) de las cuatro especies de capuchinos del sur estudiadas. Para cada componente principal retenido se indica su cambio en función de la distancia geográfica (r) y la significancia de esta relación (p).

Especie	CANTOS SIMPLES						CANTOS COMPLEJOS					
	PC1		PC2		PC3		PC1		PC2		PC3	
	r	***p***	***r***	***p***	***r***	***p***	***r***	***p***	***r***	***p***	***r***	***p***
S. hypoxantha	0,07	***0,01***	0,27	***0,0001***	0,03	0,16	0,01	0,33	0,01	0,32	0,00	0,42
S. iberaensis	-0,14	0,89	0,06	0,31	0,20	0,07	0,13	***0,03***	-0,05	0,95	0,17	***0,01***
S. palustris	-0,02	0,47	0,05	0,32	-0,04	0,58	-0,03	0,74	-0,06	0,98	-0,09	0,99
S. ruficollis (incluyendo *rufi-S*)	0,49	***0,0001***	0,01	0,37	0,02	0,26	0,02	0,28	0,00	0,45	0,00	0,42
S. ruficollis (excluyendo *rufi-S*)	0,07	***0,002***	-0,03	0,90	0,12	***0,0001***	-0,05	0,67	0,25	***0,02***	-0,04	0,59

4.3.6. SOLAPAMIENTO DE LOS ESPACIOS ACÚSTICOS DE LAS POBLACIONES

De manera complementaria a los análisis previos, se estudió de manera explícita el nivel de solapamiento entre poblaciones en su espacio acústico generando modelos lineales a partir de los componentes principales obtenidos para cada uno de los cuatro conjuntos de datos (analizando como unidad los elementos o los cantos y utilizando cantos simples y complejos). Para los cantos simples, los espacios acústicos construidos en base a las variables tanto por elemento como por canto tuvieron, como era de esperar, un solapamiento significativamente superior cuando las poblaciones contrastadas pertenecieron a la misma especie ($p < 0,04$ en ambas aproximaciones, **Tabla Suplementaria 4.6**). El solapamiento de los espacios acústicos no mostró diferencias entre poblaciones heteroespecíficas simpátricas y alopátricas, ni para los elementos ni para los cantos ($p > 0,5$ en ambas aproximaciones; **Figura 4.10, Tabla Suplementaria 4.6**).

Contrariamente a lo que ocurre con los cantos simples, y a lo que se podría esperar, los cantos complejos no presentan un mayor solapamiento cuando las poblaciones contrastadas pertenecen a la misma especie que cuando son de especies diferentes ($p > 0$, 5 tanto a nivel de elementos como de cantos; **Figura 4.10, Tabla Suplementaria 4.6**). Tampoco hubo diferencias significativas entre poblaciones heteroespecíficas alopátricas y simpátricas en su grado de solapamiento ($p > 0,3$; **Figura 4.10, Tabla Suplementaria 4.6**).

Finalmente, las pruebas de Mantel mostraron que no hay un efecto de la distancia geográfica entre las poblaciones sobre el grado de solapamiento de sus vocalizaciones, ni a nivel de cantos ni a nivel de sus elementos constitutivos ($p > 0,1$ en las cuatro comparaciones, **Tabla Suplementaria 4.7**).

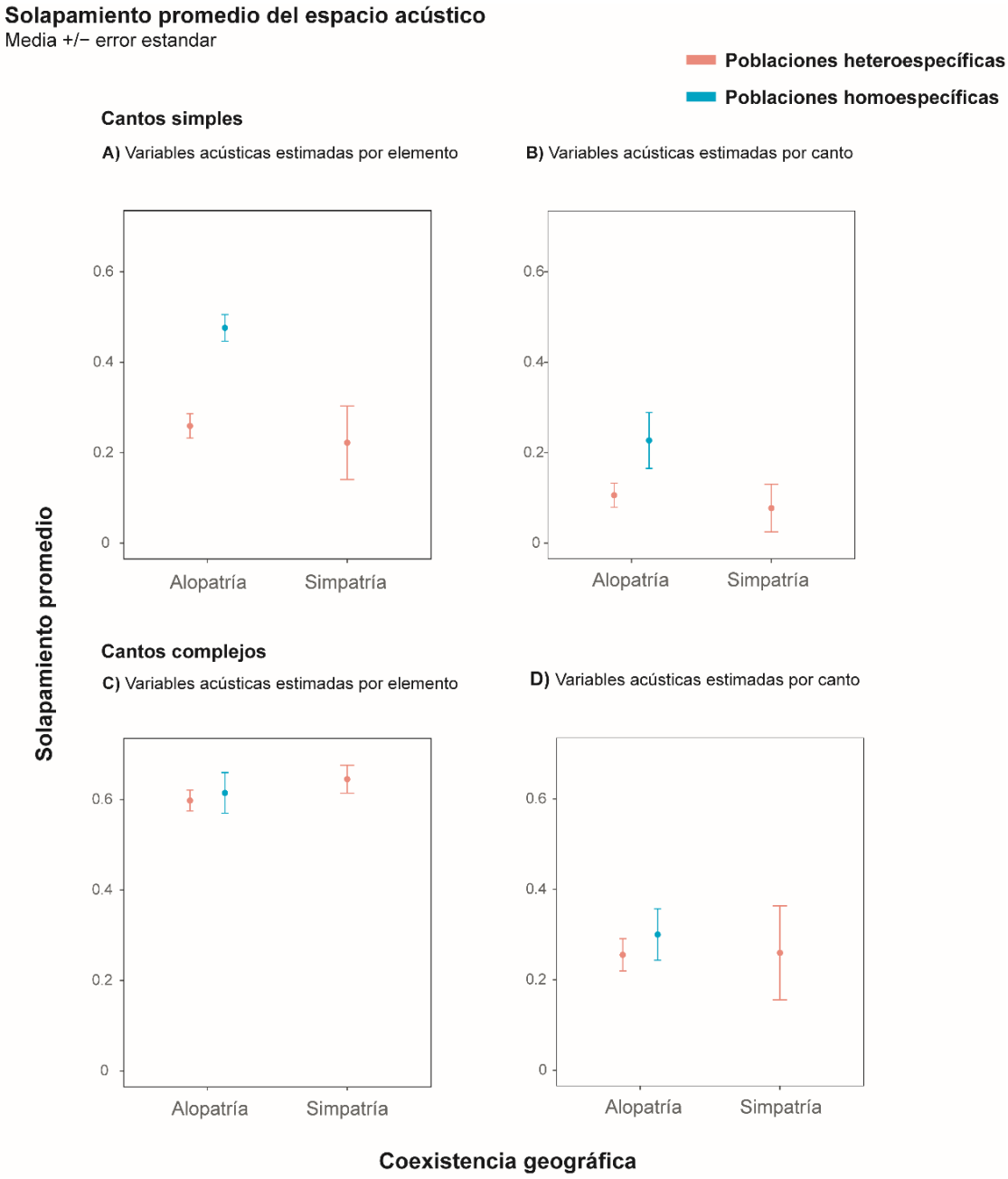


Figura 4. 10: Solapamiento promedio del espacio acústico de las poblaciones. Para cantos simples y complejos se representan gráficamente la media (± SE) del solapamiento promedio de los espacios acústicos (construidos en base a variables acústicas estimadas por elemento y por canto) de las poblaciones homo y heteroespecíficas de acuerdo con su estado de coexistencia geográfica (simpatría vs. alopatría). Las barras celestes representan el solapamiento de poblaciones homoespecíficas y las barras rosadas el solapamiento de poblaciones heteroespecíficas.

4.4. DISCUSIÓN

Este capítulo de la tesis constituyó el primer análisis de las vocalizaciones de los capuchinos en el que se consideraron de manera diferenciada y complementaria la variación entre especies y entre poblaciones de cada especie, sumándose el hecho también de haberse estudiado de manera separada las vocalizaciones simples y complejas, analizándose las diferencias en sus patrones de variación y diferenciación. Cada uno de estos análisis, además, se realizó tanto considerando los cantos en su conjunto como a través del estudio de cada uno de sus elementos constitutivos.

Este enfoque permitió caracterizar y distinguir las vocalizaciones de las cuatro especies focales de capuchinos y de sus poblaciones, arrojando resultados congruentes y complementarios entre sí. Adicionalmente, reveló patrones diferentes entre los cantos simples y complejos, lo que respalda las observaciones a campo que sugieren el uso de estos dos tipos de vocalizaciones dependiendo del contexto en el que se encuentran los individuos. Estos diferentes patrones, además, permiten inferir que los cantos simples y complejos responden a diferentes presiones evolutivas y/o ecológicas. A continuación se repasan los principales resultados del capítulo, se profundizan estos aspectos y se discuten sus implicancias.

4.4.1. LAS VOCALIZACIONES DE LAS CUATRO ESPECIES FOCALES Y SU DIFERENCIACIÓN

Desde el punto de vista auditivo, los cantos simples se diferenciaron claramente entre las especies (y sus poblaciones), permitiendo reconocerlas con facilidad en el campo. Comportamentalmente, y de manera congruente con lo reportado previamente (Repenning et al. 2010), durante el muestreo se advirtió que estos cantos se emitieron repetidamente en contextos distendidos (por ejemplo, durante el forrajeo), o como preludio de una secuencia larga de notas variables (cantos complejos) que se produjeron luego de intrusiones territoriales naturales o simuladas mediante *playback*.

Los análisis de las vocalizaciones simples a través de las variables consideradas a nivel de todo el canto mostraron que permiten diferenciar a las especies de capuchinos, pero que presentan niveles bajos de diferenciación. Esto se ve claramente en el PC1, el factor con mayor porcentaje de explicación de variación de las vocalizaciones, en el que prácticamente no hubo diferencias significativas entre las especies (ver **Figura 4.6**, **Tabla 4.4**). La similitud general observada en las variables acústicas se condice con la baja variabilidad genética, fenotípica y ecológica descripta para

las especies del grupo (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2012, 2015, 2017, Capítulo II), así como con el hecho de que se trata de una radiación muy reciente.

Siguiendo con el análisis de PC1, vale la pena destacar que *S. ruficollis* y *S. hypoxantha* exhibieron la mayor variabilidad en dicho componente, algo previsible si se tiene en cuenta que son las especies mejor representadas del set de datos y que son los capuchinos con distribución geográfica más amplia para los que, además, se conocen varios dialectos (dos para *S. ruficollis* y cinco para *S. hypoxantha*; Areta et al. 2011, Areta & Repenning 2011). De hecho, las variables acústicas por canto representadas en PC1 variaron con la distancia geográfica inter-individual en ambas especies. Todo esto explicaría también por qué estas dos especies poseen una diversidad de notas en sus cantos simples significativamente superior a la observada para *S. palustris* (una especie de distribución acotada y sin dialectos conocidos; Areta 2008).

El resto de las variables acústicas que describieron las vocalizaciones simples no difirieron uniformemente ni diferenciaron a las cuatro especies a la vez. Por el contrario, variaron en distintas combinaciones y por ende diferentes variables (o PCs) permitieron caracterizar a cada una de las especies estudiadas. Temporalmente las vocalizaciones simples de *S. hypoxantha* y *S. iberaensis* se destacaron por poseer notas más largas e intervalos entre sus notas mayores que las de *S. ruficollis* y *S. palustris*, algo que incidió notablemente en la tasa de canto de las especies (acentuadamente superior en *S. ruficollis* y *S. palustris*). Por otro lado, los cantos simples de *S. palustris* se distinguieron del resto por tener notas con frecuencias y anchos de banda mayores, y por poseer (al igual que *S. hypoxantha*) frecuencias pico promedio elevadas. Las altas frecuencias y los anchos de banda amplios de las vocalizaciones simples de esta especie podrían maximizar la transmisibilidad del mensaje en ambientes en donde generalmente su abundancia relativa respecto a otros capuchinos (como *S. hypoxantha*) es baja. Así, como se ha visto para otros animales, las altas frecuencias de *S. palustris* serían adecuadas para sortear el enmascaramiento interespecífico (Hamao et al. 2016) y facilitarían la transmisión del mensaje a largas distancias (Naguib & Wiley 2001, Halfwerk et al. 2015). Finalmente, las notas de los cantos simples de *S. iberaensis* fueron más simétricas y planas que las notas del resto de los cantos simples estudiados. Estas diferencias estructurales implican cambios en la forma de los elementos, es decir, cambios en el tipo de notas utilizadas. Estos cambios son más drásticos que las modificaciones en la frecuencia y la duración de las vocalizaciones, y podrían asociarse con la diferenciación genómica y morfológica de *S. iberaensis* respecto a *S.*

hypoxantha, *S. palustris* y *S. ruficollis* (Turbek et al. 2021, Capítulo II). De hecho, estudios anteriores de nuestro grupo han mostrado que el uso de distintos tipos de sílabas es un buen parámetro para caracterizar y distinguir a los capuchinos del sur (Campagna et al. 2012).

Las vocalizaciones complejas resultaron más similares entre las especies que las vocalizaciones simples. No obstante, se observaron diferencias asociadas fundamentalmente con la complejidad, la diversidad y la duración de los cantos, que permitieron también (como en los cantos simples) la distinción de las vocalizaciones de las cuatro especies de capuchinos.

Cabe destacar que *S. iberaensis* mostró los cantos complejos más largos y con la mayor cantidad y diversidad de notas del grupo, presentando además elementos más planos y simétricos que los otros tres capuchinos del estudio. Esta diferenciación en la estructura y la complejidad de las vocalizaciones (sumada a resultados equivalentes para los cantos simples) muestra que acústicamente *S. iberaensis* es la especie más diferenciada del conjunto analizado. Adicionalmente, la elevada complejidad y variabilidad interindividual observada en las vocalizaciones complejas de *S. iberaensis* serían un indicio de que este carácter se encuentra en esta especie bajo presiones significativas de selección natural y/o sexual (Catchpole 1987, Leitão et al. 2006, Ballentine 2009). Si los cantos complejos son emitidos fundamentalmente durante contiendas y cortejos, un macho con un aumento en la complejidad de los mismos sería más competitivo para defender sus territorios de otros machos (homoespecíficos o heteroespecíficos; Rose et al. 2022), algo que podría ser particularmente favorecido por la selección en *S. iberaensis* por ser una especie restringida en el uso del hábitat para nidificación (Turbek et al. 2019). En línea con esta argumentación, la variabilidad interindividual encontrada tras evaluar el efecto de la distancia geográfica sobre las propiedades globales y las frecuencias pico promedio, sugeriría que en esta especie los repertorios y la diversidad acústica son importantes (Catchpole 1987).

Por otro lado, y a diferencia de lo que ocurrió para los cantos simples, *S. hypoxantha* tuvo los cantos complejos más sencillos del grupo: cantos breves compuestos por un número y una diversidad de notas menor a la de los cantos de los otros tres capuchinos. Como se ha mencionado, esta especie es abundante y cuenta con una de las distribuciones más amplias de la radiación, algo atribuible a su menor especificidad de hábitat y consecuente capacidad de habitar pastizales con diferentes características y en distintas ecorregiones (Areta & Repenning 2011). Esto podría tener dos efectos

complementarios. Por un lado, si la defensa de los territorios es conseguida emitiendo cantos complejos, una mayor flexibilidad en el uso de los territorios pondría una menor presión sobre los mismos que en especies muy especialistas, pudiendo llevar incluso a su simplificación (especialmente si esto conlleva un menor costo a la hora de vocalizar). A su vez, los cantos complejos más sencillos serían más flexibles ante una gran variedad de condiciones ambientales (Kawaga et al 2012).

Si bien las tasas de canto suelen ser bajas para las aves de pastizal (Catchpole & Slater 2003, Mason & Burns 2015), *S. palustris* se destacó por mostrar notas e intervalos de tiempo cortos, y tasas de cantos complejos elevadas. Este incremento en las tasas de canto podría contribuir a la disuasión de invasiones territoriales (como se ha visto en algunas comunidades de aves y ranas; Catchpole & Slater 2003, Filer et al. 2021) y a la atracción de hembras (Garamszegi & Møller 2004), aspectos fundamentales para los machos de una especie poco abundante y restringida en el uso del hábitat (Vizentín- Bugoni et al. 2013).

4.4.2. LA VARIABILIDAD DE LAS VOCALIZACIONES ENTRE LAS POBLACIONES

Los cantos simples de las poblaciones muestreadas difirieron en varias combinaciones de parámetros acústicos en patrones que en ciertos casos parecieron ajustar a la hipótesis de desplazamiento divergente de caracteres en función del grado de simpatría con otros capuchinos. Desde una perspectiva global, se distinguió que las variables acústicas que sintetizaron las propiedades de los cantos simples (resumidas en PC1) adoptaron direcciones opuestas cuando dos o más especies de capuchinos vocalizaban en la misma localidad. Así, mientras que las especies mostraron propiedades acústicas similares en alopatría, en simpatría exhibieron patrones ligeramente distintos. Por ejemplo, las poblaciones de *S. ruficollis* tuvieron cantos simples globalmente más parecidos con poblaciones alopátricas de *S. hypoxantha* de Esteros del Iberá que con poblaciones simpátricas de dicha especie en Entre Ríos y Mar Chiquita. Complementariamente, el análisis del resto de los componentes permitió desmenuzar el espacio acústico multidimensional de los capuchinos e interpretar por separado las oscilaciones vocales de sus poblaciones en tiempo, frecuencia y estructura.

En aves y ranas se ha demostrado que los parámetros de tiempo y frecuencia de las señales acústicas suelen modificarse a fin de evitar el enmascaramiento causado por las señales de otras especies

cercanas o por el ruido ambiental (Slabbekoorn & Smith 2002, Luther & Derryberry 2012, Wilson et al. 2016, Filer et al. 2021). Aquí, se vio que los capuchinos del sur difirieron acústicamente en la duración de las notas y de los intervalos de sus cantos simples (PC2) en simpatría, pero que mostraron duraciones comparables con algunas de las poblaciones con las que están en alopatría. Por ejemplo, las especies del grupo que se reproducen en Esteros del Iberá se segregaron temporalmente en la duración de sus elementos y otras variables temporales de sus cantos; no obstante, aunque la población local de *S. hypoxantha* no se superpuso en esta dimensión con *S. iberaensis*, si lo hicieron las poblaciones alopátricas de Entre Ríos y Mar Chiquita. En Entre Ríos ocurre algo similar, ya que los valores de PC2 del análisis a nivel de elementos están claramente diferenciados entre las poblaciones de *S. hypoxantha* y *S. ruficollis* de dicha localidad, mientras que los valores de la población de *S. ruficollis* de Entre Ríos sí se superponen con la población de *S. hypoxantha* de Mar Chiquita y de Esteros del Iberá. Así mismo, para las variables temporales generales estimadas por canto, *S. ruficollis* se distinguió de las poblaciones de *S. hypoxantha* simpátricas (de Mar Chiquita y Entre Ríos) pero no de la población alopátrica de *S. hypoxantha* de Esteros del Iberá. Las poblaciones simpátricas también tendieron a diferir en las frecuencias máximas y en los anchos de banda de sus cantos simples. No obstante, *S. hypoxantha* y *S. palustris* en Esteros del Iberá tuvieron frecuencias pico promedio elevadas y similares, algo que podría ocurrir si sus cantos convergen en respuesta a una presión ambiental común, o si existe una intensa competencia por esa porción del espacio acústico (Catchpole & Slater 2003, Wilkins et al. 2013, Filer et al. 2021). Ambas explicaciones son plausibles si se considera que en la localidad estas especies establecen territorios en sitios contiguos y que cantan en la misma franja horaria (observaciones personales).

Los cantos complejos de los capuchinos del sur mostraron patrones diferentes a los encontrados para los cantos simples. En primer lugar, y de modo general, el grado de diferenciación en las vocalizaciones complejas entre poblaciones fue considerablemente menor. En particular, las vocalizaciones complejas tendieron a poseer un notorio solapamiento acústico entre las diferentes especies en simpatría en comparación con los cantos simples, y a discrepar más en alopatría.

La cuantificación objetiva del solapamiento de los espacios acústicos de las distintas poblaciones de capuchinos reveló resultados consistentes y complementarios a los hallados con los modelos lineares mixtos, y confirmó que la dinámica de los distintos tipos de cantos varía según el estado de

simpatría y alopatría. Así, mientras que las vocalizaciones simples de las distintas especies de capuchinos tendieron ocupar distintos espacios acústicos en simpatría, las vocalizaciones complejas tendieron a converger en alopatría. Todo esto señalaría que los distintos tipos de cantos cumplen roles comportamentales diferentes durante la comunicación y que, por lo tanto, se encuentran sujetos a presiones ecológicas y evolutivas distintas.

4.4.3. IMPLICANCIAS Y POSIBLES EXPLICACIONES DE LOS PATRONES HALLADOS

Cuando dos o más especies se encuentran en simpatría hay distintas razones por las cuales sus cantos podrían divergir. Por un lado, las probabilidades de hibridación aumentan si las especies son filogenéticamente cercanas. Así, si los híbridos tienen un menor fitness, las presiones de selección suelen favorecer la diferenciación de los caracteres fenotípicos y comportamentales involucrados en la elección de pareja (Brown & Wilson 1956, Wilkins et al. 2013, Uy et al. 2018). Por otro lado, las vocalizaciones pueden tender a diferenciarse para evitar su superposición en el espacio acústico, algo que ocurre especialmente si las especies son cercanas filogenéticamente y por lo tanto tienden a tener cantos similares (Kirschel et al. 2009, Filer et al. 2021).

Estudios previos han mostrado que las señales acústicas de los capuchinos del sur tienen un rol relevante durante el reconocimiento entre machos (Benites et al. 2015, Turbek et al. 2021) e indudablemente también lo tienen durante el emparejamiento selectivo. Dada la coexistencia en simpatría de las especies del grupo y su extrema cercanía filogenética y consecuente similitud vocal, los aspectos arriba mencionados cobran particular relevancia. Sin embargo, hasta el momento no se habían explorado analítica e independientemente los distintos tipos de cantos que producen, ni la variación de estos en diferentes escenarios de simpatría y alopatría.

Aquí se encontró que los cantos simples difieren sustancialmente entre las poblaciones simpátricas de las distintas especies, pero no necesariamente entre las poblaciones alopátricas de dichas especies (difieren en algunos casos, pero no en otros). Teniendo en cuenta que en el campo se ha observado que esta secuencia corta de notas sencillas es emitida de manera regular y rutinaria cuando los machos están relajados (Repenning et al. 2010, Areta et al. 2011, observaciones personales), es posible especular que los cantos simples son emitidos a modo de identificación y advertencia para dar a conocer su presencia en un territorio a potenciales parejas reproductivas o a otros machos (Slater 2000, Nelson & Poesel 2006, Rosel et al. 2021). A su vez, estos cantos serían

menos costosos que los cantos complejos y brindarían información sobre la identidad y la ubicación de los individuos de forma clara y sencilla (Gil & Gahr 2002, Rose et al. 2021). Dado este posible rol de estas vocalizaciones (en contraposición a la atracción de la hembra), puede pensarse que esta tendencia a la diferenciación en el espacio acústico podría haber estado mediada por una presión de selección tendiente a evitar el enmascaramiento, permitiendo que el mensaje sea recibido correctamente incluso por receptores distantes. Este tipo de procesos, de hecho, se ha documentado en señales identificatorias sencillas de otras aves y ranas (Wilkins et al. 2013, Wilson et al. 2016, Filer et al. 2021).

Las vocalizaciones de las aves suelen ser indicadoras del estatus y de la calidad de los individuos, por ello durante contiendas territoriales y cortejos es frecuente observar un incremento en la energía invertida en el canto y su complejización (Catchpole & Slater 2003, Slater 2000, Rose et al. 2021). Particularmente, en los capuchinos del sur se ha encontrado que los machos emiten enérgicamente cantos complejos (acompañados de vuelos y otros movimientos corporales) cuando disputan un territorio con otro macho y también cuando cortejan hembras (Repenning et al. 2010, observaciones personales). Los análisis de cantos complejos desarrollados en este capítulo indican que, dentro de los límites acústicos de cada especie, cuando dos o más especies de capuchinos del sur se reproducen en simpatría parecerían incrementar la superposición de sus espacios acústicos y converger en las propiedades de sus cantos. Este incremento en la similitud de las señales acústicas transmitidas a corta distancia entre especies filogenéticamente cercanas de una misma comunidad podría reflejar presiones de selección ecológica y/o sexual dentro y entre las especies de la radiación (Slabbekoorn & Smith 2002, Cardoso & Price 2010, Wilkins et al. 2013).

Los capuchinos del sur no solo son similares morfológica y genéticamente, sino que también lo son ecológicamente (Di Giacomo et al. 2016, Billerman et al. 2022). Esta similitud ecológica podría propiciar la competencia interespecífica por los territorios y sus recursos entre las especies del grupo. Teniendo en cuenta que los capuchinos responden a vocalizaciones de otras especies del grupo cuando se simulan invasiones territoriales (aunque en menor medida que a los cantos homoespecíficos; Benites et al. 2015A, Turbek et al. 2021), el desplazamiento convergente de las señales acústicas complejas podría disminuir los costos de la competencia interespecífica como se ha visto en ruiseñores del género *Luscinia* (Reif et al. 2015). Por otro lado, dado que la diferenciación entre poblaciones en algunas variables acústicas se incrementó con la distancia geográfica, la

convergencia acústica de los cantos complejos podría no ser consecuencia de la interacción de las especies en simpatría, sino más bien reflejar una respuesta común a las mismas presiones ambientales (Seddon 2005, Derryberry 2009). Adicionalmente, numerosos estudios comportamentales han encontrado que las hembras prefieren machos con despliegues comportamentales y caracteres sexuales más elaborados (Hill 1994, Slater 2010). En aves, la evidencia sugiere que los machos con los repertorios más grandes y los cantos más complejos son los que tienen mayor éxito reproductivo (Catchpole & Slater 2003, Slater 2010). Si esto ocurre también en los capuchinos del sur, entonces es posible que los machos incorporen notas o propiedades de los cantos de otras especies a sus repertorios vocales para complejizarlos. Esto sería relativamente sencillo si se tiene en cuenta que el canto en el grupo es aprendido y que no solo vocalizan durante la temporada reproductiva sino también en los sitios de hibernada en donde se pueden hallar varias especies juntas cantando a la vez (Areta 2012). También, la incorporación de elementos de otras especies se ha reportado dentro del género *Sporophila* (Thomas 1996), e incluso Areta & Repenning (2011) han observado que pueden tener elementos similares a los de otras especies de aves que componen la comunidad en la que habitan (como el chingolo, *Zonotrichia capensis* y el Crispín, *Tapera naevia*).

Si las vocalizaciones tienen un rol fundamental durante el emparejamiento selectivo de los capuchinos del sur (Turbek et al. 2021), resta comprender cómo las especies del grupo pueden converger en las propiedades de sus cantos complejos cuando ocurren en simpatría y mantener su identidad. De hecho, aunque la hibridación en cautiverio es posible (Campagna et al. 2018) y se ha reportado en zonas de contacto de otras dos especies de la radiación en el sur de Brasil (Mendolago et al. 2020), no se han descripto híbridos para las especies estudiadas en este capítulo. Varias hipótesis (no necesariamente excluyentes) podrían explicar este fenómeno. Por un lado, el emparejamiento selectivo podría sostenerse entre las especies si los distintos tipos de vocalizaciones proporcionan información diferente, y si el reconocimiento especie-específico se basa principalmente en las secuencias cortas de notas altamente estereotipadas aquí denominadas cantos simples (Slater 2000, Nelson & Poesel 2007). Por otro lado, es posible que como se ha visto en otras aves (Seddon & Tobias 2010), las hembras de los capuchinos tengan la capacidad de discernir en base a variaciones sutiles de la estructura de los cantos y elementos. Adicionalmente, es relevante recordar que el reconocimiento no solo ocurriría en base a las vocalizaciones, sino que

sería respaldado por claves visuales basadas en los patrones de coloración del plumaje de los machos (Turbek et al. 2021).

4.4.4. EFECTO DEL AISLAMIENTO GEOGRÁFICO: EL CASO DE LA POBLACIÓN DE SALTA DE *S. RUFICOLLIS*.

Los resultados de este capítulo sugieren que la selección natural y sexual actúan diferencialmente sobre los distintos tipos de vocalizaciones de los capuchinos del sur. No obstante, al menos parte de la variabilidad acústica descubierta sería producto de la distancia y el aislamiento geográfico entre las poblaciones, factores que son clave para que ciertos elementos acústicos se fijen diferencialmente entre poblaciones, o, por el contrario, haya flujo de los mismos (Catchpole & Slater 2003, Wilkins et al. 2013).

El ejemplo más extremo de esto lo constituye la población de *S. ruficollis* que se encuentra en la provincia de Salta, cuyos resultados han sido de los más sorpresivos y novedosos del capítulo. Notablemente, esta población mostró diferencias en múltiples dimensiones acústicas con el resto de las poblaciones de capuchinos en ambos tipos de cantos (simples y complejos), divergiendo incluso con otras poblaciones de *S. ruficollis*. De hecho, la magnitud de la diferencia vocal con otras poblaciones de la misma especie fue comparable a la observada en contrastes interespecíficos (por ejemplo, como cuando se comparara *S. iberaensis* con el resto de los capuchinos focales). La población es nueva en los registros ornitológicos y hasta el momento no ha sido formalmente descripta. Es posible que muestre un nuevo dialecto, distinto al mesopotámico (es decir las poblaciones de *S. ruficollis* de Entre Ríos y Esperanza) y quizá también al del Alto Madidi (Bolivia; descriptos por Areta 2011). Existen múltiples razones (no excluyentes entre sí) que explicarían por qué esta población posee tal diferenciación vocal. La primera, y probablemente la más parsimoniosa, se vincularía con el distanciamiento geográfico de esta población salteña con las poblaciones analizadas en el centro y este de Argentina. Dicho aislamiento geográfico impediría el flujo de individuos entre poblaciones, restringiendo el flujo de notas entre las mismas y facilitando el surgimiento y la fijación de nuevas variables vocales (Catchpole & Slater 2003, Wilkins et al. 2013). Así mismo, la ausencia de otras especies de capuchinos del sur en la localidad permitiría que esta población explote distintas dimensiones del espacio acústico sin las restricciones impuestas por la presencia de otras especies filogenética y ecológicamente similares. Finalmente, las condiciones

ambientales y geográficas que ofrecen los territorios en Salta y la comunidad aviar de los pastizales de la zona podrían estar redefiniendo la ventana acústica de la especie en esta localidad.

4.4.5. CONSIDERACIONES FINALES

En este capítulo por primera vez se prueba la importancia de analizar y contextualizar de manera independiente los diferentes tipos de vocalizaciones de los capuchinos del sur. En general, los resultados encontrados indican que la variabilidad acústica sería producto de una combinación de procesos de desplazamiento de caracteres y de divergencia por distanciamiento geográfico. Sin embargo, no toda la variabilidad acústica hallada entre las especies y las poblaciones tendría implicancias evolutivas, y parte se podría atribuir a la plasticidad de este carácter. Algunas de las propiedades acústicas que difirieron en función del estado de simpatría son flexibles (como las frecuencias máximas y el intervalo entre notas), y probablemente sean más dinámicas y vulnerables a la variabilidad local, requiriendo de más tiempo y de presiones de selección constantes para interferir en los procesos diversificadores del grupo. Sin embargo, otras variables acústicas (como la estructura y la diversidad de notas) podrían implicar cambios de impacto evolutivo más directo, constituyendo la materia prima para el surgimiento de dialectos y de barreras reproductivas (Campagna et al. 2011, Wilkins et al. 2013).

Aún quedan muchas incógnitas en torno a las vocalizaciones de los capuchinos del sur y su rol durante los procesos de diversificación del grupo. Para llegar a conclusiones más certeras en relación con el desplazamiento de caracteres acústicos en función al grado de simpatría entre las especies sería importante balancear el muestreo y sumar poblaciones alopátricas. El siguiente paso sería cuantificar la respuesta de machos y hembras a cantos simples y complejos de machos locales y foráneos a fin de estimar de forma directa las implicancias evolutivas reales de la diversidad vocal encontrada. Así mismo, los análisis acústicos comparativos entre poblaciones podrían complementarse con estudios de otros caracteres morfológicos y ecológicos que podrían también estar desplazándose en las zonas de simpatría (como la coloración del plumaje, la morfometría espermática, los hábitos de forrajeo, etc) y con estudios moleculares que reflejen la diversidad vocal encontrada. Esto último sería particularmente interesante si se contrastan las poblaciones de *S. ruficollis* del centro-este de Argentina con las de Salta.

Finalmente, aunque hasta el momento los esfuerzos se han concentrado principalmente en comprender las bases moleculares de la coloración de los capuchinos del sur, análisis de genómica funcional y de expresión génica podrían explicar las diferencias halladas en relación a ciertas propiedades acústicas como, por ejemplo, las tasas de canto y la complejidad de las vocalizaciones. Esto es sin dudas más complejo que con la coloración, dado que como se ha mostrado en los capítulos anteriores los genes asociados a la melanogénesis son relativamente fáciles de identificar cuando presentan diferencias (y lo mismo ocurre con otros modelos avianos que poseen colores que se deben a otros pigmentos, tales como los carotenos; por ejemplo, Aguillon et al. 2021). En el caso de las vocalizaciones, los análisis genómicos mostrarán diferencias en genes más difíciles de identificar, como por ejemplo aquellos involucrados en múltiples características morfológicas de la siringe o el pico, e incluso genes responsables de las diferencias en el aprendizaje de los cantos. Así, esta siguiente etapa constituye indudablemente un desafío que podría potencialmente llevar a resultados muy novedosos.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

Durante años la especiación alopátrica ha sido el paradigma central para explicar los procesos de diversificación de los seres vivos (Futuyma & Mayer 1980, Felsenstein 1981, Coyne & Orr 2004, Bolnick & Fitzpatrick 2007). Este mecanismo encontraba fácilmente correlato en la naturaleza (Coyne & Orr, 1989, 1997, Sasa et al. 1998, Jiggins et al. 2001, Price & Bouvier 2002, Tubaro & Lijtmaer 2002, Lijtmaer et al. 2003, Arrieta et al. 2013, Macagno et al. 2020) y se ajustaba elegantemente al modelo de incompatibilidad híbrida propuesto por Dobzhansky y Muller (Dobzhansky 1937, Muller 1940, 1942, Mayr 1942, 1963, Presgraves 2010). Recientemente, sin embargo, la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva y el mejoramiento de la teoría y el análisis de datos de genética de poblaciones han revelado que la especiación con flujo génico es mucho más frecuente de lo que se pensaba (Servedio et al. 2011, Feder et al. 2012, Martins et al. 2013, Poelstra et al. 2014, Lamichhaney et al. 2015, Oswald et al. 2017, Richards et al. 2019, Winker 2021). Este revolucionario descubrimiento ha descontracturado los estudios evolutivos, impulsado perspectivas mucho más flexibles que conciben a la evolución como un proceso dinámico a la luz de interpretaciones integrales que combinan datos genómicos, morfológicos, ecológicos y biogeográficos. De esta forma, el desafío actual en biología evolutiva no es meramente resolver la dicotomía entre especiación alopátrica o simpátrica, sino más bien explicar como la selección (natural y sexual) promueve la diversificación incluso en presencia de flujo génico (Getz et al. 2016, Ravinet et al. 2017, Foote 2018).

El Neotrópico concentra la mayor diversidad de aves del planeta y alberga vastos escenarios para el estudio de sus procesos evolutivos (Stotz et al. 1996, Newton 2003); no obstante, ha sido históricamente mucho menos explorado que otras regiones notoriamente menos diversas como, por ejemplo, el Neártico (Beheregaray 2008, Turchetto-Zolet et al. 2013, Reddy 2014, Lees et al. 2020). La mayoría de los estudios evolutivos neotropicales se han enfocado en describir procesos de diversificación alopátrica valiéndose de la gran cantidad de barreras geográficas naturales (actuales y pasadas) de la región como la Cordillera de los Andes (Weir 2006, Weir & Price 2011, Valderrama et al. 2014), los ríos amazónicos (Ribas et al 2012, Naka & Brumfield 2018, Kopuchian et al. 2020) y el corredor de vegetación abierta que separa la Selva Atlántica del complejo Selvas Andinas-Amazonía (Lavinia et al. 2015, 2019, Trujillo-Arias et al. 2017, Cabanne et al. 2019). En esta tesis se estudió la radiación adaptativa de los capuchinos del sur del género *Sporophila*, un grupo

de pequeñas aves semilleras que se reproducen en simpatría en los pastizales al sur del Río Amazonas y que poseen además una gran similitud genética, morfológica y ecológica (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2012, 2015, 2017, Di Giacomo & Kopuchian 2016, Billerman et al. 2022). Para ello, y con el propósito de comprender cómo la selección ha posibilitado la radiación rápida de los capuchinos en simpatría, en esta tesis se llevaron a cabo distintas aproximaciones genómicas, morfológicas y comportamentales que proporcionaron datos novedosos y reveladores sobre la diversificación del grupo. De esta manera, los resultados reportados aquí no solo contribuyen a entender mejor las circunstancias y los procesos que propiciaron la radiación rápida de este carismático y enigmático grupo de aves, sino que, paralelamente y en un escenario más general, también incrementan nuestro conocimiento sobre los procesos diversificadores y especiogénicos del Neotrópico y contribuyen con la ruptura del paradigma de especiación puramente alopátrica.

A lo largo de la tesis se desarrollan distintos enfoques orientados a definir el papel que ha tenido la selección en el proceso de especiación de los capuchinos del sur. En una primera aproximación (capítulo dos) se expandieron los análisis de genomas completos realizados por Campagna et al. 2017 mediante la incorporación de secuencias de *S. ruficollis* y *S. iberaensis*, dos especies de la radiación que no habían sido exploradas. Esto permitió utilizar más de 120 genomas completos y aumentar así el número de contrastes genómicos de pares de especies y profundizar sobre la arquitectura genómica que sustenta la diferenciación del grupo. Estas incorporaciones también ofrecieron por primera vez la oportunidad de comparar *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis*, tres especies particularmente interesantes por su asombrosa similitud morfológica y ecológica, y por su alto grado de simpatría durante la temporada reproductiva. En este capítulo también se realizaron las primeras aproximaciones generales que indagaron si existe algún tipo de correlación entre la diferencia en los patrones de coloración y la divergencia genómica de las especies del grupo, un análisis que nunca había sido llevado a cabo a esta escala en los capuchinos. En sintonía, y dando continuidad a los resultados del capítulo dos que confirman que la divergencia genómica del grupo se vincula estrechamente con genes de la melanogénesis y con las diferencias en la coloración de las especies, en el capítulo tres se realizaron análisis de GWAS (*genome wide association analyses*) que profundizaron en detalle sobre las bases genómicas de la coloración de los capuchinos del sur. Estos análisis permitieron correlacionar de manera directa variables genómicas con la variación en la concentración de melanina de las plumas de los distintos parches del plumaje, una aproximación (al menos hasta donde sé) nunca antes realizada en este tipo de estudios evolutivos. Esto permitió

analizar qué genes se relacionan con cada cambio de coloración de los parches de plumaje, cómo se combinan dichos genes en diferentges casos y qué regiones de los mismos, o en general qué regiones circundantes, están involucradas en la determinación del color de cada parche. Finalmente, en el capítulo cuatro se analizaron vocalizaciones de las cuatro especies focales de la tesis (*S. hypoxantha*, *S. palustris*, *S. ruficollis* y *S. iberaensis*), que al tener distribuciones de muy diferente amplitud y solapamiento variable se reproducen en distintos escenarios de simpatría y alopatría local en el norte de nuestro país. Se realizaron análisis directos de las vocalizaciones para describirlas, estudiar su diferenciación y analizar su relevancia en el mantenimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo entre estas especies, una aproximación que pocos trabajos han tenido hasta el momento con los capuchinos (Campagna et al. 2012, Repenning & Fontana 2019) y que además en este caso ha sido realizada con este subgrupo de especies que como dijimos son particularmente similares desde el punto de vista genético, morfológico y ecológico. Adicionalmente en dicho capítulo se compararon por primera vez vocalizaciones de distintas poblaciones evaluando el efecto de la distancia geográfica y (principalmente) de la condición de simpatría y alopatría de las especies focales. Se destaca aquí también el análisis independiente de los distintos tipos de cantos (simples y complejos) que emiten los capuchinos, una estrategia que permitió contextualizar los resultados obtenidos luego de desmenuzar el espacio acústico multidimensional de las vocalizaciones (en variables acústicas globales y estructurales) y de estimar objetivamente el grado de solapamiento acústico entre las poblaciones muestreadas. A continuación se destacan los principales aspectos de los resultados de cada uno de estos capítulos y su interpretación integral cuando se los considera conjuntamente.

Luego de más de 16 años de investigación molecular en torno a la radiación de los capuchinos del sur (Lijtmaer et al. 2004, Campagna et al. 2010, 2012, 2015), los análisis de genomas completos de cinco especies realizados por Campagna et al. (2017) consiguieron identificar 25 islas de divergencia genómica en un grupo que hasta el momento había sido indistinguible genéticamente a pesar de las conspicuas diferencias fenotípicas de los machos. Esta primera exploración reveló que las áreas de divergencia del genoma se repiten en distintos contrastes de pares de especies y que contienen frecuentemente genes que participan de la melanogénesis, sugiriendo que al menos las diferencias observables en los patrones de coloración de los capuchinos del sur tendrían correlato genómico y un papel fundamental durante la diversificación del grupo. En el capítulo dos de esta tesis se ha avanzado en varios aspectos sobre esos primeros análisis de genómica, incorporando dos especies

más al análisis y muchos más genomas de los que se habían utilizado en aquel entonces. En primer lugar, se pudieron confirman con mayor soporte y profundidad los resultados que habían obtenido Campagna y colaboradores, incluyendo la preponderancia de los genes de la síntesis de melanina en la diferenciación entre las especies, el hecho de que las diferencias ocurren primordialmente en las regiones regulatorias y no en las codificantes, e incluso la relevancia del cromosoma X, que presentó una mayor proporción de islas de divergencia que la esperada por su representación en el genoma. También pudo corroborarse que las especies del grupo no pueden separarse en base a sus genomas, aun cuando se trabaje con genomas completos, pero sí en base a las porciones específicas en las que se diferencian.

Por otro lado, la inclusión de *S. ruficollis* permitió contar en estos análisis con las tres especies del grupo que se diferencian únicamente en el color de su garganta, que es color canela en *S. hypoxantha* (continuando con la coloración de su parte ventral), blanca en *S. palustris* y negra justamente en *S. ruficollis*. Esto permitió confirmar que estas especies son efectivamente las que tienen menor divergencia, presentando diferencias en muy pocos genes a lo largo de todo su genoma. A mayor escala, el análisis de todo el grupo de los capuchinos del sur mostró una correlación entre el grado de diferenciación del color entre las especies y su diferenciación genómica, un análisis que no se había realizado previamente y que aporta un resultado sumamente interesante para comprender el rol de los cambios de color en la evolución del grupo.

Por último, quisiera destacar que en el segundo capítulo se avanza de manera más certera sobre la noción de modularidad genómica de la coloración que ya se había planteado en el primer estudio genómico de Campagna et al. (2017), constatando con este set de datos más completo que existe un número fijo de parches de coloración en los capuchinos, y que la coloración de los mismos es gobernada por combinaciones específicas de variantes génicas. Este tema, como se verá más abajo, se retoma de manera más profunda en el capítulo tres.

Algunos de los resultados de este segundo capítulo han sido además integrados con otro estudio de los capuchinos que ha sido realizado en colaboración con investigadores de Corrientes y de Estados Unidos, que se concentra en el análisis de la recientemente descubierta *Sporophila iberaensis* (una de las especies focales de esta tesis) e integra aspectos principalmente genómicos y comportamentales, y ha sido publicado recientemente (Turbek et al. 2021).

Mientras que en el capítulo dos se hicieron inferencias indirectas sobre la base genética de la coloración de los capuchinos explorando las regiones de divergencia genómica que existen entre los contrastes de pares de especies del grupo, en el capítulo tres se estudió la asociación directa de variantes genéticas con concentraciones de eumelanina y feomelanina de las plumas mediante GWAS. Estos análisis eran necesarios para poder estudiar qué genes, y en qué combinaciones, estaban efectivamente involucrados en la definición de la coloración de los diferentes parches de plumaje. Estos análisis ratificaron que la variabilidad observada en los patrones de coloración del grupo es consecuencia de la interacción de múltiples regiones genómicas que (mayoritariamente) contienen genes vinculados con la melanogénesis. Notablemente, los resultados revelaron también que, aunque una misma región genómica puede incidir en la pigmentación de varios parches del plumaje, la coloración de cada parche depende de una combinación única de regiones genómicas. A su vez, la inspección minuciosa de las regiones asociadas con la coloración ahondó aún más en la naturaleza modular de este carácter revelando que las variables genéticas dentro de dichas regiones se agrupan en zonas ligeramente distintas en torno a los genes de coloración dependiendo del parche, sugiriendo que diferentes elementos regulatorios controlan la expresión en los distintos parches del plumaje.

Finalmente, en el capítulo tres también se realizó un análisis focalizado en tres especies de capuchinos que difieren solo en la coloración de la garganta. Esto reveló que no solamente la coloración de los parches está gobernada por combinaciones únicas de genes, sino que además las diferentes transiciones de color de un dado parche dependen de diferentes genes, o combinaciones de los mismos. Así, la diferencia entre la garganta canela de *S. hypoxantha* y la garganta blanca de *S. palustris* depende de variantes en genes diferentes que la diferencia entre la garganta canela de *S. hypoxantha* y la garganata negra de *S. ruficollis*.

Los resultados del capítulo tres, por su parte, han sido publicados recientemente, reflejándose en dicho artículo las principales conclusiones aquí vertidas (Estalles et al. 2022).

Más allá de estos análisis de cada capítulo y su significancia, los resultados tomados en su conjunto permiten avanzar en varios aspectos de la historia evolutiva del grupo. En primer lugar, se había podido asumir de manera indirecta hasta ahora que las diferencias entre las especies residían justamente en los genes que les dan su diferente coloración, ya que se había visto que las islas de

diferenciación entre las mismas con tenían justamente genes involucrados en la melanogénesis (Campagna et al. 2017). El mayor muestreo de esta tesis, sumado a los análisis de GWAS permite confirmar que efectivamente es así, ya que son esencialmente las mismas regiones que diferencian a las especies las que se asocian significativamente con cambios en la concentración de melanina. Se confirma también, como se dijo más arriba, que son regiones no codificantes, y presumiblemente regulatorias, las que varían asociadas a los cambios de coloración. Esto es de suma relevancia para comprender la historia evolutiva del grupo, ya que justamente las mutaciones en regiones no codificantes habrían favorecido la radiación rápida del grupo porque al no comprender la función de los genes en sí mismos, pueden ocurrir a una tasa sensiblemente superior (Martin & Orgogozo 2013).

Por otro lado, quizás el resultado más significativo de estos análisis genómicos complementarios para comprender la evolución y radiación explosiva de los capuchinos sea la profundización y confirmación de la modularidad del sistema que regula su coloración. Brevemente, queda claro que nuevas combinaciones de variantes génicas pueden generar nuevos patrones de coloración, y que por ende la variabilidad genética presente en el grupo puede ser suficiente para generar estos nuevos morfos por eventos de reordenamiento (o *re-shuffling* en inglés), sin la necesidad de nuevas mutaciones. Dicho reordenamiento podría ocurrir, por ejemplo, por eventos poco frecuentes de hibridación. A su vez, por efecto de la selección (principalmente sexual en este caso) los nuevos morfos de color tenderían a no reproducirse con los anteriores y comenzarían a diferenciarse en aislamiento (a pesar de su posible simpatría), generando eventualmente nuevas especies sin la necesidad de nuevas mutaciones y el tiempo que esto conlleva. Este tipo de modularidad y su efecto evolutivo había sido planteado para ciertos cíclidos (Roberts et al. 2017) y mariposas del género *Heliconius* (Van Belleghem et al. 2017), pero hasta ahora no había sido postulado en aves. Es sin dudas un mecanismo que podría ser responsable no solamente de la radiación explosiva de los capuchinos del sur, sino que podría también explicar otras radiaciones de aves cuyas especies son actualmente simpátricas.

Más allá de la clara relevancia del color como mecanismo de aislamiento reproductivo pre-cigótico, estudios previos han planteado la importancia de las vocalizaciones como otro mecanismo con dicha función, dadas las diferencias entre los cantos de las distintas especies (Campagna et al. 2012) y las respuestas diferenciales ante los cantos homo- y hetero-específicos (Benites et al. 2015). Más

recientemente, los experimentos de *playback* desarrollados por Turbek et al. (2021) han profundizado en la importancia de las vocalizaciones en este contexto, ya que han demostrado que el reconocimiento entre machos de dos especies altamente sintópicas (*S. hypoxantha* y *S. iberaensis*) ocurre en base al conjunto de claves acústicas y visuales que distingue a cada especie. En el capítulo cuatro de esta tesis se caracterizaron y diferenciaron acústicamente cuatro especies de capuchinos del sur de similitud genética y morfológica variable (*S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* son más similares entre sí que con *S. iberaensis*), y se evaluó el efecto que tiene la interacción de estas especies sobre el uso del espacio acústico. Para ello se realizaron por primera vez no solamente comparaciones entre especies, sino también entre poblaciones, con especial énfasis en cubrir sitios de simpatría entre diferentes combinaciones de especies y otros en los cuales algunas de ellas se encuentran en alopatría, sin compartir el ambiente con ninguna otra. A esto se sumó el análisis diferenciado entre distintos tipos de cantos (simples y complejos), que son utilizados en diferentes contextos, lo que también posibilitó por primera vez contrastar patrones de diferenciación y posibles presiones de selección entre los mismos.

Con respecto al análisis y diferenciación de las vocalizaciones entre las cuatro especies focales, se confirmó que las mismas, tal como ocurre en general con los capuchinos del sur (Campagna et al 2012) son acústicamente muy similares. No obstante, se observó que el espacio acústico multidimensional de los capuchinos puede diferir en combinaciones específicas de distintas dimensiones (o variables). Por ejemplo, *S. hypoxantha*, *S. palustris* y *S. ruficollis* difirieron marcadamente de *S. iberaensis* en las variables que caracterizan el tipo de notas empleadas durante el canto, un parámetro acústico que en trabajos previos ha sido útil para distinguir las especies del género (Campagna et al. 2012) y que en este caso sugerirían un mayor grado de disimilitud acústica de *S. ibereraensis* respecto a las otras tres especies, reflejando lo que ocurre a nivel genético y de coloración.

Uno de los resultados más relevantes del análisis fue que los contrastes de poblaciones alopátricas y simpátricas sugirieron que la variabilidad acústica en estas especies resulta de la combinación tanto del desplazamiento de caracteres mediado por selección como de la diferenciación causada por la distancia geográfica y consecuente deriva vocal. Con respecto al primero de estos factores, quisiera destacar que los cantos simples y complejos tendieron a variar en direcciones opuestas e independientes en función de la condición de simpatría y alopatría de las poblaciones: mientras que

los cantos simples mostraron una tendencia hacia diferenciarse entre las especies cuando estas están en simpatría, los cantos complejos tendieron a converger al compartir las especies el ambiente. La contextualización de este resultado considerando el comportamiento vocal del grupo observado en el campo ofrece la oportunidad de explicar este resultado que a primera vista puede parecer contradictorio. Los cantos simples, que suelen ser emitidos rutinariamente en situaciones de calma, como por ejemplo forrajeo, o como introducción de cantos complejos (Repenning et al. 2010), divergieron en distintos parámetros del espacio acústico en simpatría, algo que indicaría que la diferenciación en este tipo de cantos es importante para el reconocimiento especie-específico. Por el contrario, los cantos complejos, producidos principalmente durante el cortejo y contiendas territoriales (Repenning et al. 2010) tendieron a converger y solaparse en el espacio acústico en simpatría, un resultado que podría indicar que estos cantos no son fundamentales para el reconocimiento y que, por ende, pueden ser permeables y susceptibles al flujo interespecífico de elementos cuando las diferentes especies se reproducen en proximidad. Finalmente, en este capítulo se encontró que la distancia geográfica es importante para la variabilidad vocal probablemente porque restringe la migración de los individuos y por ende también de sus notas, algo que quedó ejemplificado al contrastar las poblaciones de *S. ruficollis* del noreste argentino con la población distante de Salta.

5.1 CONSIDERACIONES FINALES

En esta tesis se ha estudiado la diversificación de los capuchinos del sur realizando un análisis transversal orientado a explorar la divergencia genómica global del grupo, desentrañar el sustrato genómico que da forma a la diversidad de patrones de coloración de la radiación y examinar el espacio acústico multidimensional de las vocalizaciones de los capuchinos en diferentes contextos de simpatría y alopatría local. Tomados en conjunto, los resultados de estas aproximaciones no solo contribuyen a la profundización del entendimiento general de los procesos de diversificación biológica en presencia de flujo génico de las aves del neotrópico, sino que además revalorizan enfáticamente el rol de los mecanismos de aislamiento reproductivo precigótico y de las presiones de selección durante dichos procesos (Marcondes 2022, Rubin et al. 2022). En sintonía con los trabajos realizados previamente en los capuchinos y aquellos llevados a cabo en paralelo a esta tesis, esta investigación concluye que son justamente estos mecanismos de aislamiento reproductivo precigótico los que median que el reordenamiento de variantes genómicas ancestrales y la regulación modular de los patrones de coloración en el grupo hayan conducido a la radiación

rápida de los capuchinos del sur a pesar de su alto grado de simpatría. Dicho de otro modo, los nuevos patrones de coloración que pueden generarse a una alta tasa por el reordenamiento de variantes génicas pre-existentes, sin la necesidad de nuevas mutaciones, quedan aislados de los morfos ya presentes en el área como resultado de la selección sexual durante emparejamiento selectivo, promoviéndose así su divergencia y eventual especiación.

De este modo, el estudio de la historia evolutiva de los capuchinos del sur contribuye a la deconstrucción del paradigma evolutivo de la especiación alopátrica como única explicación posible de la generación de biodiversidad, proponiendo nuevos escenarios de diversificación mucho más fluidos y dinámicos. De hecho, buena parte de los resultados reportados aquí ya han sido publicados (parte de los resultados del capítulo dos en Turbek et al. 2021 y los resultados del capítulo tres en Estalles et al. 2022), fortaleciendo el posicionamiento de esta radiación adaptativa como referente del nuevo paradigma evolutivo de especiación con flujo génico. No obstante, esta tesis lejos de poner punto final al tema, abre un abanico de interrogantes que dirigen la atención a nuevas investigaciones orientadas (entre varios aspectos) a explorar las bases genéticas de la variabilidad acústica descripta, evaluar experimentalmente la posible funcionalidad diferencial de los distintos tipos de cantos, e indagar otras posibles barreras precigóticas o postcigóticas que favorezcan el mantenimiento de los límites de las especies de la radiación en simpatría como, por ejemplo, la diferenciación morfométrica de las gametas, la preferencia dietaria y el uso del hábitat. Algunos de estos futuros estudios ya están en marcha.

BIBLIOGRAFÍA

Abolins-Abols, M., Kornobis, E., Ribeca, P., Wakamatsu, K., Peterson, M. P., Ketterson, E. D., & Milá, B. (2018). Differential gene regulation underlies variation in melanic plumage coloration in the dark-eyed junco (Junco hyemalis). Molecular Ecology, 27(22), 4501–4515.

Aguillon, S. M., Walsh, J., & Lovette, I. J. (2021). Extensive hybridization reveals multiple coloration genes underlying a complex plumage phenotype. Proceedings. Biological Sciences, 288(1943), 20201805.

Albert, J., Uy, C., Irwin, D. E., & Webster, M. S. (2018). Behavioral Isolation and Incipient Speciation in Birds. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 49, 1-24.

Allender, C. J., Seehausen, O., Knight, M. E., Turner, G. F., & Maclean, N. (2003). Divergent selection during speciation of Lake Malawi cichlid fishes inferred from parallel radiations in nuptial coloration. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(24), 14074-14079.

Araya-Salas, M., & Odom, K. (2022). PhenotypeSpace: an R package to quantify and compare phenotypic trait spaces R package version 0.1.0.

Araya-Salas, M., & Smith-Vidaurre, G. (2017). warbleR: an R package to streamline analysis of animal acoustic signals. Methods in Ecology and Evolution, 8(2), 184–191.

Areta, J. I. (2008). Entre Ríos Seedeater (Sporophila zelichi): A species that never was. Journal of Field Ornithology, 79(4), 352–363.

Areta, J. I. (2012). Winter Songs Reveal Geographic Origin of Three Migratory Seedeaters (Sporophila spp.) in Southern Neotropical Grasslands. The Wilson Journal of Ornithology, 124(4), 688–697.

Areta, J. I., Noriega, J. I., Pagano, L. G., & Roesler, I. (2011). Unravelling the ecological radiation of the capuchinos: systematics of Dark-throated Seedeater Sporophila ruficollis and description of a new dark-collared form. Bulletin of the British Ornithologists' Club, 131(1), 4–23.

Areta, J. I., & Repenning, M. (2011). Systematics of the Tawny-bellied Seedeater (Sporophila hypoxantha). I. Geographic Variation, Ecology, and Evolution of Vocalizations. The Condor, 113(3), 664–677.

Arnaiz-Villena, A., Alvarez-Tejado, M., Ruiz-del-Valle, V., Garcia-De-La-Torre, C., Varela, P., Recio, M. J., Ferre, S., & Martinez-Laso, J. (1998). Phylogeny and rapid northern and southern hemisphere speciation of goldfinches during the Miocene and Pliocene epochs. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 54(9), 1031–1041.

Arrieta, R. S., Lijtmaer, D. A., & Tubaro, P. L. (2013). Evolution of postzygotic reproductive isolation in galliform birds: analysis of first and second hybrid generations and backcrosses. Biological Journal of the Linnean Society, 110(3), 528–542.

Avital, E., Jablonka, E., Backwell, P., Jennions, M., Passmore, N., & Christy, J. (2000). Animal traditions: behavioural inheritance in evolution. Cambridge University Press.

Baker, M. C., & Baker, A. E. M. (1990). Reproductive behavior of female buntings: isolating mechanisms in a hybridizing pair of species. Evolution, 44(2), 332–338.

Ballentine, B. (2009). The ability to perform physically challenging songs predicts age and size in male swamp sparrows, Melospiza georgiana. Animal Behaviour, 77(4), 973–978.

Barluenga, M., Stölting, K. N., Salzburger, W., Muschick, M., & Meyer, A. (2006). Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. Nature, 439(7077), 719–723.

Barrera-Guzmán, A. O., Aleixo, A., Shawkey, M. D., & Weir, J. T. (2018). Hybrid speciation leads to novel male secondary sexual ornamentation of an Amazonian bird. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(2), E218–E225.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. Fitting Linear Mixed-E ects Models Using lme. Journal of Statistical Software, 67(1), 1-48.

Baxter, L. L., Watkins-Chow, D. E., Pavan, W. J., & Loftus, S. K. (2019). A curated gene list for expanding the horizons of pigmentation biology. Pigment Cell and Melanoma Research, 32(3), 348–358. Blackwell Publishing Ltd.

Beheregaray, L. B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. Molecular Ecology, 17(17), 3754–3774.

Beltrán, D. F., Shultz, A. J., & Parra, J. L. (2021). Speciation rates are positively correlated with the rate of plumage color evolution in hummingbirds. Evolution, 75(7), 1665–1680.

Benites, P., Campagna, L., & Tubaro, P. L. (2015). Song-based species discrimination in a rapid Neotropical radiation of grassland seedeaters. Journal of Avian Biology, 46(1), 55–62.

Benites, P., Eaton, M. D., Lijtmaer, D. A., Lougheed, S. C., & Tubaro, P. L. (2010). Analysis from avian visual perspective reveals plumage colour differences among females of capuchino seedeaters (Sporophila). Journal of Avian Biology, 41(6), 597–602.

Benkman, C. W. (2003). Divergent selection drives the adaptive radiation of crossbills. Evolution, 57(5), 1176–1181.

Berlocher, S. H., & Feder, J. L. (2002). Sympatric speciation in Phytophagous. Annual Review of Entomology, 47, 773–815.

Billerman, S. M., Keeney, B. K., Rodewald, P. G., Schulenberg, T. S., & (Editors). (2022). Birds of the World (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, & T. S. Schulenberg, Eds.). Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY, USA.

Binaafar, S., Razmara, E., Mahdieh, N., Sahebjame, H., Tavasoli, A. R., & Garshasbi, M. (2020). A novel missense variant in GPT2 causes non-syndromic autosomal recessive intellectual disability in a consanguineous Iranian family. European Journal of Medical Genetics, 63(5), 103853.

Bolnick, D. I., & Fitzpatrick, B. M. (2007). Sympatric speciation: models and empirical evidence. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 459-487.

Boul, K. E., Chris Funk, W., Darst, C. R., Cannatella, D. C., & Ryan, M. J. (2007). Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 274(1608), 399–406.

Brown, W. L., & Wilson, E. O. (1956). Character displacement. Systematic Zoology, 5(2), 49–64.

Browning, S. R., & Browning, B. L. (2007). Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. American Journal of Human Genetics, 81(5), 1084–1097.

Bruders, R., van Hollebeke, H., Osborne, E. J., Kronenberg, Z., Maclary, E., Yandell, M., & Shapiro, M. D. (2020). A copy number variant is associated with a spectrum of pigmentation patterns in the rock pigeon (Columba livia). PLoS Genetics, 16(5), 1–25.

Brumm, H. (2006). Signalling through acoustic windows: Nightingales avoid interspecific competition by short-term adjustment of song timing. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 192(12), 1279–1285.

Cabanne, G. S., Campagna, L., Trujillo-Arias, N., Naoki, K., Gómez, I., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., Dantas, G. P. M., Aleixo, A., Claramunt, S., & others. (2019). Phylogeographic variation within the Buff-browed Foliage-gleaner (Aves: Furnariidae: Syndactyla rufosuperciliata) supports an Andean-Atlantic forests connection via the Cerrado. Molecular Phylogenetics and Evolution, 133, 198–213.

Campagna, L., Benites, P., Lougheed, S. C., Lijtmaer, D. A., di Giacomo, A. S., Eaton, M. D., & Tubaro, P. L. (2012). Rapid phenotypic evolution during incipient speciation in a continental avian radiation. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 279(1734), 1847–1856.

Campagna, L., Gronau, I., Silveira, L. F., Siepel, A., & Lovette, I. J. (2015). Distinguishing noise from signal in patterns of genomic divergence in a highly polymorphic avian radiation. Molecular Ecology, 24(16), 4238–4251.

Campagna, L., Lijtmaer, D. A., Kerr, K. C. R., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N., Lougheed, S. C., & Tubaro, P. L. (2010). DNA barcodes provide new evidence of a recent radiation in the genus Sporophila (Aves: Passeriformes). Molecular Ecology Resources, 10(3), 449–458.

Campagna, L., Repenning, M., Silveira, L. F., Fontana, C. S., Tubaro, P. L., & Lovette, I. J. (2017). Repeated divergent selection on pigmentation genes in a rapid finch radiation. Science Advances, 3(5).

Campagna, L., Rodriguez, P., & Mazzulla, J. C. (2018). Transgressive phenotypes and evidence of weak postzygotic isolation in F1 hybrids between closely related capuchino seedeaters. PloS One, 13(6), e0199113.

Campagna, L., Silveira, L. F., Tubaro, P. L., & Lougheed, S. C. (2013). Identifying the sister species to the rapid capuchino seedeater radiation (Passeriformes: Sporophila). The Auk, 130(4), 645–655.

Campbell, C. R., Poelstra, J. W., & Yoder, A. D. (2018). What is Speciation Genomics? The roles of ecology, gene flow, and genomic architecture in the formation of species. Biological Journal of the Linnean Society, 124(4), 561-583.

Cardoso, G. C., & Price, T. D. (2010). Community convergence in bird song. Evolutionary Ecology, 24(2), 447–461.

Catchpole, C. K. (1987). Bird song, sexual selection and female choice. Trends in Ecology & Evolution, 2(4), 94–97.

Catchpole, C. K., & Slater, P. J. (2003). Bird song: biological themes and variations. Cambridge university press.

Chitnis, S. S., Rajan, S., & Krishnan, A. (2020). Sympatric wren-warblers partition acoustic signal space and song perch height. Behavioral Ecology, 31(2), 559–567.

Coyne, J. A., & Orr, H. A. (1989). Patterns of speciation in Drosophila. Evolution, 43(2), 362–381.

Coyne, J. A., & Orr, H. A. (1997). 'Patterns of speciation in Drosophila' revisited. Evolution, 295–303.

Coyne, J. A. & Orr, H. A. (2004) Speciation. Sinauer Associates Sunderland, 37.

Cruickshank, T. E., & Hahn, M. W. (2014). Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow. Molecular Ecology, 23(13), 3133–3157.

Cuthill, I. C., Allen, W. L., Arbuckle, K., Caspers, B., Chaplin, G., Hauber, M. E., ... & Caro, T. (2017). The biology of color. Science, 357(6350), eaan0221.

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., & Al, E. (2011). The variant call format and VCFtools. Bioinformatics, 27(15), 2156-2158.

Darwin, C. (1859). On the Origin of Species.

Dawson, A. (2008). Control of the annual cycle in birds: endocrine constraints and plasticity in response to ecological variability. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363(1497), 1621–1633. Royal Society.

De Cáceres, M., Brotons, L., Aquilué, N., & Fortin, M. J. (2013). The combined effects of land-use legacies and novel fire regimes on bird distributions in the Mediterranean. Journal of Biogeography, 40(8), 1535–1547.

De Kort, S. R., den Hartog, P. M., & ten Cate, C. (2002). Diverge or merge? The effect of sympatric occurrence on the territorial vocalizations of the vinaceous dove Streptopelia vinacea and the ring-necked dove S. capicola. Journal of Avian Biology, 33(2), 150–158.

De Schauensee, R. M. (1952). A review of the genus Sporophila. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 104, 153–196.

Del Bino, S., Ito, S., Sok, J., Nakanishi, Y., Bastien, P., Wakamatsu, K., & Bernerd, F. (2015). Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. Pigment Cell and Melanoma Research, 28(6), 707–717.

Demery, A. J. C., Burns, K. J., & Mason, N. A. (2021). Bill size, bill shape, and body size constrain bird song evolution on a macroevolutionary scale. The Auk, 138(2), ukab011.

Derryberry, E. P. (2009). Ecology shapes birdsong evolution: variation in morphology and habitat explains variation in white-crowned sparrow song. The American Naturalist, 174(1), 24–33.

Derryberry, E. P., Phillips, J. N., Derryberry, G. E., Blum, M. J., & Luther, D. (2020). Singing in a silent spring: Birds respond to a half-century soundscape reversion during the COVID-19 shutdown. Science, 370(6516), 575–579.

Di Giacomo, A. S., & Kopuchian, C. (2016). Una nueva especie de capuchino (Sporophila: Thraupidae) de los Estero del Iberá, Corrientes, Argentina. Nuestras Aves, 61, 3–5.

Dobzhansky, T. (1937). Genetic nature of species differences. The American Naturalist, 71(735), 404–420.

Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. Journal of Statistical Software, 22, 1–20.

Ellegren, H., Smeds, L., Burri, R., Olason, P. I., Backström, N., Kawakami, T., Künstner, A., Mäkinen, H., Nadachowska-Brzyska, K., Qvarnström, A., Uebbing, S., & Wolf, J. B. W. (2012). The genomic landscape of species divergence in Ficedula flycatchers. Nature, 491(7426), 756–760.

Feder, J. L., Berlocher, S. H., Roethele, J. B., Dambroski, H., Smith, J. J., Perry, W. L., Gavrilovic, V., Filchak, K. E., Rull, J., & Aluja, M. (2003). Allopatric genetic origins for sympatric host-plant shifts and race formation in Rhagoletis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(18), 10314–10319.

Feder, J. L., Egan, S. P., & Nosil, P. (2012). The genomics of speciation-with-gene-flow. Trends in Genetics, 28(7), 342–350.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution, 17(6), 368–376.

Fernandes, A. M., Wink, M., & Aleixo, A. (2012). Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (Myrmeciza hemimelaena) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. Journal of Biogeography, 39(8), 1524–1535.

Filer, A., Burchardt, L. S., & van Rensburg, B. J. (2021). Assessing acoustic competition between sibling frog species using rhythm analysis. Ecology and Evolution, 11(13), 8814–8830.

Filloy, J., & Bellocq, M. I. (2006). Spatial variations in the abundance of Sporophila seedeaters in the southern Neotropics: contrasting the effects of agricultural development and geographical position. Biodiversity & Conservation, 15(10), 3329–3340.

Fisher-Reid, M. C., Engstrom, T. N., Kuczynski, C. A., Stephens, P. R., & Wiens, J. J. (2013). Parapatric divergence of sympatric morphs in a salamander: incipient speciation on Long Island? Molecular Ecology, 22(18), 4681–4694.

Foote, A. D. (2018). Sympatric speciation in the genomic era. Trends in Ecology and Evolution, 33(2), 85–95. Elsevier Ltd.

Funk, E. R., & Taylor, S. A. (2019). High-throughput sequencing is revealing genetic associations with avian plumage color. Auk, 136(4), 1–7.

Futuyma, D. J., & Mayer, G. C. (1980). Non-allopatric speciation in animals. Systematic Biology, 29(3), 254–271.

Galván, I., & Solano, F. (2016). Bird integumentary melanins: biosynthesis, forms, function and evolution. International Journal of Molecular Sciences, 17(4), 520.

Garamszegi, L. Z., & Møller, A. P. (2004). Extrapair paternity and the evolution of bird song. Behavioral Ecology, 15(3), 508–519.

Gavrilets, S., & Losos, J. B. (2009). Adaptive radiation: contrasting theory with data. Science, 323(5915), 732–737.

Gavrilets, S., & Vose, A. (2005). Dynamic patterns of adaptive radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(50), 18040-18045.

Getz, W. M., Salter, R., Seidel, D. P., & van Hooft, P. (2016). Sympatric speciation in structureless environments Theories and models. BMC Evolutionary Biology, 16(1).

Givnish, T. J., Millam, K. C., Mast, A. R., Paterson, T. B., Theim, T. J., Hipp, A. L., Henss, J. M., Smith, J. F., Wood, K. R., & Sytsma, K. J. (2009). Origin, adaptive radiation and diversification of the Hawaiian lobeliads (Asterales: Campanulaceae). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276(1656), 407–416.

Gomes, A. C. R., Sorenson, M. D., & Cardoso, G. C. (2016). Speciation is associated with changing ornamentation rather than stronger sexual selection. Evolution, 70(12), 2823–2838.

Grant, B. R., & Grant, P. R. (1979). Darwin's finches: population variation and sympatric speciation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(5), 2359–2363.

Grant, B. R., & Grant, P. R. (2010). Songs of Darwin's finches diverge when a new species enters the community. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(47), 20156–20163.

Grant, P. R., & Grant, B. R. (1992). Hybridization of bird species. Science, 256(5054), 193–197.

Grant, P. R., & Grant, B. R. (1997). Hybridization, sexual imprinting, and mate choice. The American Naturalist, 149(1), 1–28.

Gunnarsson, U., Hellström, A. R., Tixier-Boichard, M., Minvielle, F., Bed'hom, B., Ito, S., Jensen, P., Rattink, A., Vereijken, A., & Andersson, L. (2007). Mutations in SLC45A2 cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. Genetics, 175(2), 867–877.

Haldane, J. B. S. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. Journal of Genetics, 12(2), 101–109.

Halfwerk, W., & Slabbekoorn, H. (2015). Pollution going multimodal: the complex impact of the human-altered sensory environment on animal perception and performance. Biology Letters, 11(4).

Hamao, S., Sugita, N., & Nishiumi, I. (2016). Geographic variation in bird songs: examination of the effects of sympatric related species on the acoustic structure of songs. Acta Ethologica, 19(1), 81–90.

Han, F., Lamichhaney, S., Grant, B. R., Grant, P. R., Andersson, L., & Webster, M. T. (2017). Gene flow, ancient polymorphism, and ecological adaptation shape the genomic landscape of divergence among Darwin's finches. Genome Research, 27(6), 1004–1015.

Hedrick, P. W. (2013). Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. Molecular Ecology, 22(18), 4606–4618.

Hejase, H. A., Salman-Minkov, A., Campagna, L., Hubisz, M. J., Lovette, I. J., Gronau, I., & Siepel, A. (2020). Genomic islands of differentiation in a rapid avian radiation have been driven by recent selective sweeps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(48), 30554–30565.

Hendry, A. P., Huber, S. K., de Leon, L. F., Herrel, A., & Podos, J. (2009). Disruptive selection in a bimodal population of Darwin's finches. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276(1657), 753–759.

Hermansen, J. S., Haas, F., Trier, C. N., Bailey, R. I., Nederbragt, A. J., Marzal, A., & Sætre, G.-P. (2014). Hybrid speciation through sorting of parental incompatibilities in Italian sparrows. Molecular Ecology, 23(23), 5831–5842.

Hill, G. E. (2015). Mitonuclear ecology. Molecular Biology and Evolution, 32(8), 1917–1927.

Hill, G. E. (2017). The mitonuclear compatibility species concept. The Auk: Ornithological Advances, 134(2), 393–409.

Hill, G. E. (2019). Reconciling the mitonuclear compatibility species concept with rampant mitochondrial introgression. Integrative and Comparative Biology, 59(4), 912–924.

Hill, G. E., & McGraw, K. J. (2006). Bird coloration: function and evolution. Harvard University Press. Cambrigde, MA.

Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W. D., & Hearing, V. J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. Journal of Biological Chemistry, 280(14), 14006-14016.

Hubbard, J. K., Uy, J. A. C., Hauber, M. E., Hoekstra, H. E., & Safran, R. J. (2010). Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. Trends in Genetics: TIG, 26(5), 231–239.

Huber, S. K., & Podos, J. (2006). Beak morphology and song features covary in a population of Darwin's finches (Geospiza fortis). Biological Journal of the Linnean Society, 88(3), 489-498.

Hugall, A. F., & Stuart-Fox, D. (2012). Accelerated speciation in colour-polymorphic birds. Nature, 485(7400), 631–634.

Irwin, D. E., & Price, T. (1999). Sexual imprinting, learning and speciation. Heredity, 82(4), 347–354.

Irwin, E. G., & Geoghegan, J. (2001). Theory, data, methods: developing spatially explicit economic models of land use change. Agriculture, Ecosystems & Environment, 85(1–3), 7–24.

Ito, S., Nakanishi, Y., Valenzuela, R. K., Brilliant, M. H., Kolbe, L., & Wakamatsu, K. (2011). Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue

samples: Application to chemical analysis of human hair melanins. Pigment Cell and Melanoma Research, 24(4), 605–613.

Jiggins, C. D., Linares, M., Naisbit, R. E., Salazar, C., Yang, Z. H., & Mallet, J. (2001). Sex-linked hybrid sterility in a butterfly. Evolution, 55 (8).

Jiggins, C. D., Naisbit, R. E., Coe, R. L., & Mallet, J. (2001). Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. Nature, 411(6835), 302–305.

Johnson, N. K., & Cicero, C. (2002). The role of ecologic diversification in sibling speciation of Empidonax flycatchers (Tyrannidae): multigene evidence from mtDNA. Molecular Ecology, 11(10), 2065–2081.

Kagawa, H., Yamada, H., Lin, R., Mizuta, T., Hasegawa, T., & Okanoya, K. (2012). Ecological correlates of song complexity in white-rumped munias: The implication of relaxation of selection as a cause for signal variation in birdsong. Interaction Studies, 13(2), 263–284.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28(12), 1647–1649.

Keen, S. C., Odom, K. J., Webster, M. S., Kohn, G. M., Wright, T. F., & Araya-Salas, M. (2021). A machine learning approach for classifying and quantifying acoustic diversity. Methods in Ecology and Evolution, 12(7), 1213–1225.

Kenny, E. E., Timpson, N. J., Sikora, M., Yee, M. C., Moreno-Estrada, A., Eng, C., Huntsman, S., Burchard, E. G., Stoneking, M., Bustamante, C. D., & Myles, S. (2012). Melanesian blond hair is caused by an amino acid change in TYRP1. Science 336 (6081), 554.

Kirschel, A. N. G., Blumstein, D. T., & Smith, T. B. (2009). Character displacement of song and morphology in African tinkerbirds. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(20), 8256–8261.

Kirschel, A. N. G., Seddon, N., & Tobias, J. A. (2019). Range-wide spatial mapping reveals convergent character displacement of bird song. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 286(1902), 20190443.

Kodric-Brown, A. (1985). Female preference and sexual selection for male coloration in the guppy (Poecilia reticulata). Behavioral Ecology and Sociobiology, 17(3), 199–205.

Kopp, M., Servedio, M. R., Mendelson, T. C., Safran, R. J., Rodríguez, R. L., Hauber, M. E., Scordato, E. C., Symes, L. B., Balakrishnan, C. N., Zonana, D. M., & others. (2018). Mechanisms of assortative mating in speciation with gene flow: connecting theory and empirical research. The American Naturalist, 191(1), 1–20.

Kopuchian, C., Campagna, L., Lijtmaer, D. A., Cabanne, G. S., García, N. C., Lavinia, P. D., Tubaro, P. L., Lovette, I., & di Giacomo, A. S. (2020). A test of the riverine barrier hypothesis in the largest subtropical river basin in the Neotropics. Molecular Ecology, 29(12), 2137–2149.

Korunes, K. L., & Samuk, K. (2021). pixy: Unbiased estimation of nucleotide diversity and divergence in the presence of missing data. Molecular Ecology Resources, 21(4), 1359–1368.

Krishnan, A., & Tamma, K. (2016). Divergent morphological and acoustic traits in sympatric communities of Asian barbets. Royal Society Open Science, 3(8), 160117.

Kroodsma, D., Hamilton, D., Sánchez, J. E., Byers, B. E., Fandiño-Mariño, H., Stemple, D. W., Trainer, J. M., & Powell, G. V. N. (2013). Behavioral evidence for song learning in the suboscine bellbirds (Procnias spp.; Cotingidae). The Wilson Journal of Ornithology, 125(1), 1–14.

Lamichhaney, S., Fan, G., Widemo, F., Gunnarsson, U., Schwochow Thalmann, D., Hoeppner, M. P., Kerje, S., Gustafson, U., Shi, C., Zhang, H., Chen, W., Liang, X., Huang, L., Wang, J., Liang, E., Wu, Q., Ming-Yuen Lee, S., Xu, X., Höglund, J., … Andersson, L. (2015). Structural genomic changes underlie alternative reproductive strategies in the ruff (Philomachus pugnax).

Lamichhaney, S., Han, F., Berglund, J., Wang, C., Almén, M. S., Webster, M. T., Grant, B. R., Grant, P. R., & Andersson, L. (2016). A beak size locus in Darwin's finches facilitated character displacement during a drought. Science, 352(6284), 470–474.

Lamichhaney, S., Han, F., Webster, M. T., Andersson, L., Grant, B. R., & Grant, P. R. (2018). Rapid hybrid speciation in Darwin's finches. Science, 359(6372), 224–228.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods, 9(4), 357–359.

Lavinia, P. D., Barreira, A. S., Campagna, L., Tubaro, P. L., & Lijtmaer, D. A. (2019). Contrasting evolutionary histories in Neotropical birds: Divergence across an environmental barrier in South America. Molecular Ecology, 28(7), 1730–1747.

Lavinia, P. D., Escalante, P., García, N. C., Barreira, A. S., Trujillo-Arias, N., Tubaro, P. L., Naoki, K., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., & Lijtmaer, D. A. (2015). Continental-scale analysis reveals deep diversification within the polytypic Red-crowned Ant Tanager (Habia rubica, Cardinalidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 89, 182–193.

Lees, A. C., Rosenberg, K. v, Ruiz-Gutierrez, V., Marsden, S., Schulenberg, T. S., & Rodewald, A. D. (2020). A roadmap to identifying and filling shortfalls in Neotropical ornithology. The Auk, 137(4), ukaa048.

Leitão, A., ten Cate, C., & Riebel, K. (2006). Within-song complexity in a songbird is meaningful to both male and female receivers. Animal Behaviour, 71(6), 1289–1296.

Lenth, R. V. (2022). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. (https://CRAN.R-project.org/package=emmeans).

Lessa, E. P., D'ELÍA, G., & Pardinas, U. F. J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. Molecular Ecology, 19(15), 3031–3037.

Lewis, J. J., & van Belleghem, S. M. (2020). Mechanisms of change: unraveling the roles of modularity and 1 pleiotropy in diversification 2 3.

Lijtmaer, D. A. (2008) Mecanismos de adquisición y consecuencias funcionales de los dialectos de canto del chingolo (Zonotrichia capensis). Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Lijtmaer, D. A., Kerr, K. C. R., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N., & Tubaro, P. L. (2011). DNA barcode libraries provide insight into continental patterns of avian diversification. PLoS One, 6(7), e20744.

Lijtmaer, D. A., Mahler, B., & Tubaro, P. L. (2003). Hybridization and postzygotic isolation patterns in pigeons and doves. Evolution, 57(6), 1411–1418.

Lijtmaer, D. A., Sharpe, N. M. M., Tubaro, P. L., & Lougheed, S. C. (2004). Molecular phylogenetics and diversification of the genus Sporophila (Aves: Passeriformes). Molecular Phylogenetics and Evolution, 33(3), 562–579.

Lindgreen, S. (2012). AdapterRemoval: Easy cleaning of next-generation sequencing reads. BMC Research Notes, 5.

Liou, L. W., & Price, T. D. (1994). Speciation by reinforcement of premating isolation. Evolution, 48(5), 1451–1459.

Losos, J. B., Mahler, D. L. (2010). Adaptive radiation: the interaction of ecological opportunity, adaptation, and speciation. Evolution since Darwin: The First, 150, 381–420.

Losos, J. B., & Schneider, C. J. (2009). Anolis lizards. Current Biology, 19(8), R316–R318.

Lovette, I. J., Bermingham, E., & Ricklefs, R. E. (2002). Clade-specific morphological diversification and adaptive radiation in Hawaiian songbirds. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 269(1486), 37–42.

Lowry, D. B. (2012). Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species. Biological Journal of the Linnean Society, 106(2), 241–257.

Luther, D. (2009). The influence of the acoustic community on songs of birds in a neotropical rain forest. Behavioral Ecology, 20(4), 864–871.

Luther, D. A., & Derryberry, E. P. (2012). Birdsongs keep pace with city life: Changes in song over time in an urban songbird affects communication. Animal Behaviour, 83(4), 1059–1066.

Luzuriaga-Aveiga, V., Ugarte, M., & Weir, J. T. (2021). Distinguishing genomic homogenization from parapatric speciation in an elevationally replacing pair of Ramphocelus tanagers. Molecular Ecology, 30(21), 5517–5529.

Macagno, A. L. M., Edgerton, T. J., & Moczek, A. P. (2021). Incipient hybrid inferiority between recently introduced, diverging dung beetle populations. Biological Journal of the Linnean Society, 132(4), 931-44.

Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. Nature, 446(7133), 279–283.

Marcondes, R. S. (2022). Unraveling the environment-phenotype-genotype nexus: examples, lessons and prospects from bird plumage colors.

Marler, P. R., & Slabbekoorn, H. (2004). Nature's music: the science of birdsong. Elsevier.

Marques, D. A., Lucek, K., Meier, J. I., Mwaiko, S., Wagner, C. E., Excoffier, L., & Seehausen, O. (2016). Genomics of rapid incipient speciation in sympatric threespine stickleback. PLoS Genetics, 12(2).

Marques, D. A., Meier, J. I., & Seehausen, O. (2019). A combinatorial view on speciation and adaptive radiation. Trends in Ecology and Evolution, 34(6), 531–544.

Martin, A., & Orgogozo, V. (2013). The Loci of repeated evolution: a catalog of genetic hotspots of phenotypic variation. Evolution; International Journal of Organic Evolution, 67(5), 1235–1250.

Martin, S. H., Dasmahapatra, K. K., Nadeau, N. J., Salazar, C., Walters, J. R., Simpson, F., Blaxter, M., Manica, A., Mallet, J., & Jiggins, C. D. (2013). Genome-wide evidence for speciation with gene flow in Heliconius butterflies. Genome Research, 23(11), 1817–1828.

Martins, A. B., de Aguiar, M. A. M., & Bar-Yam, Y. (2013). Evolution and stability of ring species. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(13), 5080–5084.

Mason, N. A., & Burns, K. J. (2015). The effect of habitat and body size on the evolution of vocal displays in Thraupidae (tanagers), the largest family of songbirds. Biological Journal of the Linnean Society, 114(3), 538–551.

Mason, N. A., Burns, K. J., Tobias, J. A., Claramunt, S., Seddon, N., & Derryberry, E. P. (2017). Song evolution, speciation, and vocal learning in passerine birds. Evolution, 71(3), 786–796.

Mavárez, J., Salazar, C. A., Bermingham, E., Salcedo, C., Jiggins, C. D., & Linares, M. (2006). Speciation by hybridization in Heliconius butterflies. Nature, 441(7095), 868–871.

Mayr, E. (1942). Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist. Columbia University Press.

Mayr, E. (1963). Animal species and evolution. Animal species and evolution. Harvard University Press.

Meier, J. I., Stelkens, R. B., Joyce, D. A., Mwaiko, S., Phiri, N., Schliewen, U. K., Selz, O. M., Wagner, C. E., Katongo, C., & Seehausen, O. (2019). The coincidence of ecological opportunity with hybridization explains rapid adaptive radiation in Lake Mweru cichlid fishes. Nature Communications, 10(1), 5391.

Medolago, C. A., Costa, M. C., Silveira, L. F., & Francisco ID, M. R. (2020). Hybridization between two recently diverged Neotropical passerines: the Pearly-bellied seedeater Sporophila pileata, and the Copper seedeater S. bouvreuil (Aves, Passeriformes, Thraupidae). PloS one, 15(3): e0229714.

Morales, H. E., Pavlova, A., Amos, N., Major, R., Kilian, A., Greening, C., & Sunnucks, P. (2018). Concordant divergence of mitogenomes and a mitonuclear gene cluster in bird lineages inhabiting different climates. Nature Ecology & Evolution, 2(8), 1258–1267.

Muller, H. J. (1940). An analysis of the process of structural change in chromosomes of Drosophila. Journal of Genetics, 40(1), 1.

Muller, H. J. (1942). Isolating mechanisms, evolution, and temperature. Biological Symposia, 6, 71–125.

Munday, P. L. (2004). Habitat loss, resource specialization, and extinction on coral reefs. Global Change Biology, 10(10), 1642–1647.

Nadeau, N. J., Minvielle, F., & Mundy, N. I. (2006). Association of a Glu92Lys substitution in MC1R with extended brown in Japanese quail (Coturnix japonica). Animal Genetics, 37(3), 287–289.

Nadeau, N. J., Whibley, A., Jones, R. T., Davey, J. W., Dasmahapatra, K. K., Baxter, S. W., Quail, M. A., Joron, M., Ffrench-Constant, R. H., Blaxter, M. L., & others. (2012). Genomic islands of divergence in hybridizing Heliconius butterflies identified by large-scale targeted sequencing. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 367(1587), 343–353.

Naguib, M., & Wiley, R. H. (2001). Estimating the distance to a source of sound: mechanisms and adaptations for long-range communication. Animal Behaviour, 62(5), 825–837.

Naka, L. N., & Brumfield, R. T. (2018). The dual role of Amazonian rivers in the generation and maintenance of avian diversity. Science Advances, 4(8), eaar8575.

Nelson, D. A., & Marler, P. (1990). The perception of birdsong and an ecological concept of signal space.

Newton, I. (2003). Speciation and biogeography of birds. Academic Press.

Noor, M. A. F., & Bennett, S. M. (2009). Islands of speciation or mirages in the desert? Examining the role of restricted recombination in maintaining species. Heredity, 103(6), 439–444.

Noor, M. A. F., Grams, K. L., Bertucci, L. A., & Reiland, J. (2001). Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(21), 12084–12088.

Nosil, P., & Feder, J. L. (2012). Genomic divergence during speciation: causes and consequences. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 367(1587), 332–342.

Nosil, P., & Feder, J. L. (2013). Genome evolution and speciation: toward quantitative descriptions of pattern and process. Evolution, 67(9), 2461–2467.

Nosil, P., & Schluter, D. (2011). The genes underlying the process of speciation. Trends in Ecology and Evolution, 26 (4), 160–167.

Okonechnikov, K., Conesa, A., & García-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. Bioinformatics, 32(2), 292–294.

Oribe, E., Fukao, A., Yoshihara, C., Mendori, M., Rosal, K. G., Takahashi, S., & Takeuchi, S. (2012). Conserved distal promoter of the agouti signaling protein (ASIP) gene controls sexual dichromatism in chickens. General and Comparative Endocrinology, 177(2), 231–237.

Orteu, A., & Jiggins, C. D. (2020). The genomics of coloration provides insights into adaptive evolution. Nature Reviews Genetics, 21(8), 461-475.

Oswald, J. A., Overcast, I., Mauck III, W. M., Andersen, M. J., & Smith, B. T. (2017). Isolation with asymmetric gene flow during the nonsynchronous divergence of dry forest birds. Molecular Ecology, 26(5), 1386–1400.

Ouellet, H. (1992). Speciation, zoogeography and taxonomic problems in the Neotropical genus Sporophila (Aves: Emberizinae). Bulletin of the British Ornithologists' Club, 112, 225–235.

Parchman, T. L., Gompert, Z., Braun, M. J., Brumfield, R. T., McDonald, D. B., Uy, J. A. C., Zhang, G., Jarvis, E. D., Schlinger, B. A., & Buerkle, C. A. (2013). The genomic consequences of adaptive divergence and reproductive isolation between species of manakins. Molecular Ecology, 22(12), 3304–3317.

Parker, K. A., Anderson, M. J., Jenkins, P. F., & Brunton, D. H. (2012). The effects of translocation-induced isolation and fragmentation on the cultural evolution of bird song. Ecology Letters, 15(8), 778–785.

Petren, K., Grant, B. R., & Grant, P. R. (1999). A phylogeny of Darwin's finches based on microsatellite DNA length variation. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 266(1417), 321–329.

Pfennig, K. S., & Pfennig, D. W. (2009). Character displacement: ecological and reproductive responses to a common evolutionary problem. Quarterly Review of Biology, 84(3), 253–276.

Pinheiro, J., Bates, D., & R Core Team. (2022). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. https://CRAN.R-project.org/package=nlme

Podos, J. (2001). Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. Nature, 409(6817), 185-188.

Podos, J., Dybboe, R., & Jensen, M. O. (2013). Ecological speciation in Darwin's finches: parsing the effects of magic traits. Current Zoology, 59(1), 8-19.

Podos, J., Huber, S. K., & Taft, B. (2004). Bird song: the interface of evolution and mechanism. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 55-87.

Poelstra, J. W., Vijay, N., Bossu, C. M., Lantz, H., Ryll, B., Müller, I., Baglione, V., Unneberg, P., Wikelski, M., Grabherr, M. G., & Wolf, J. B. W. (2014). The genomic landscape underlying phenotypic integrity in the face of gene flow in crows. Science, 344(6190), 1410–1414.

Presgraves, D. C. (2010). Darwin and the origin of interspecific genetic incompatibilities. American Naturalist, 176(S1), S45-S60.

Price, J. J., Friedman, N. R., & Omland, K. E. (2007). Song and plumage evolution in the New World orioles (Icterus) show similar lability and convergence in patterns. Evolution, 61(4), 850–863.

Price, T. (1998). Sexual selection and natural selection in bird speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 353(1366), 251–260.

Price, T. D. (2006). Phenotypic plasticity, sexual selection and the evolution of colour patterns. Journal of Experimental Biology, 209(12), 2368–2376.

Price, T. D., & Bouvier, M. M. (2002). The evolution of postzygotic incompatibilities in birds. Evolution, 56(10), 2083–2089.

Price, T. D., Yeh, P. J., & Harr, B. (2008). Phenotypic plasticity and the evolution of a socially selected trait following colonization of a novel environment. The American Naturalist, 172(S1), S49–S62.

Price-Waldman, R. M., Shultz, A. J., & Burns, K. J. (2020). Speciation rates are correlated with changes in plumage color complexity in the largest family of songbirds. Evolution, 1–36.

Prud'homme, B., Gompel, N., & Carroll, S. B. (2007). Emerging principles of regulatory evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(S1), 8605–8612.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. American Journal of Human Genetics, 81(3), 559–575.

R Core Team. (2022). R: a language and environment for statistical computing. https://www.r-project.org/

Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 467–501.

Ravinet, M., Faria, R., Butlin, R. K., Galindo, J., Bierne, N., Rafajlović, M., Noor, M. A. F., Mehlig, B., & Westram, A. M. (2017). Interpreting the genomic landscape of speciation: a road map for finding barriers to gene flow. Journal of Evolutionary Biology, 30(8), 1450–1477. Blackwell Publishing Ltd.

Reddy, C. S., Bird, N. G., Sreelakshmi, S., Manikandan, T. M., Asra, M., Krishna, P. H., Jha, C. S., Rao, P. V. N., & Diwakar, P. G. (2019). Identification and characterization of spatio-temporal hotspots of forest fires in South Asia. Environmental Monitoring and Assessment, 191(3), 1–17.

Reif, J., Jiran, M., Reifová, R., Vokurková, J., Dolata, P. T., Petrusek, A., & Petrusková, T. (2015). Interspecific territoriality in two songbird species: potential role of song convergence in male aggressive interactions. Animal Behaviour, 104, 131–136.

Repenning, M., & Fontana, C. S. (2019). Distinguishing females of capuchino seedeaters: call repertoires provide evidence for species-level diagnosis. Revista Brasileira de Ornitologia, 27(2), 70–78.

Repenning, M., Rovedder, C. E., & Fontana, C. S. (2010). Another color morph of Sporophila seedeater from the capuchinos group (Aves, Emberizidae). Iheringia. Série Zoologia, 100(4), 369–378.

Rheindt, F. E., Norman, J. A., & Christidis, L. (2008). DNA evidence shows vocalizations to be a better indicator of taxonomic limits than plumage patterns in Zimmerius tyrant-flycatchers. Molecular Phylogenetics and Evolution, 48(1), 150–156.

Ribas, C. C., Maldonado Coelho, M., Smith, B. T., Cabanne, G. S., d'Horta, F. M., & Naka, L. N. (2012). Towards an integrated historical biogeography of the Neotropical lowland avifauna: combining diversification analysis and landscape evolution. Ornitología neotropical (23), 187–206.

Richards, E. J., Servedio, M. R., & Martin, C. H. (2019). Searching for sympatric speciation in the genomic era. BioEssays, 41(7), 1900047.

Ridgely, R. S., & Guy, T. (1989). The birds of South America: volume 1: the oscine passerines. University of Texas Press.

Rieseberg, L. H., & Willis, J. H. (2007). Plant speciation. Science, 317(5840), 910–914.

Roberts, R. B., Moore, E. C., & Kocher, T. D. (2017). An allelic series at pax7a is associated with colour polymorphism diversity in Lake Malawi cichlid fish. Molecular ecology, 26(10), 2625-2639.

Rose, E. M., Prior, N. H., & Ball, G. F. (2022). The singing question: re-conceptualizing birdsong. Biological Reviews, 97(1), 326–342.

Roux, C., Fraïsse, C., Romiguier, J., Anciaux, Y., Galtier, N., & Bierne, N. (2016). Shedding Light on the Grey Zone of Speciation along a Continuum of Genomic Divergence. PLoS Biology, 14(12).

Rovito, S. M. (2017). The geography of speciation in Neotropical salamanders. Herpetologica, 73(3), 229–241.

Rubin, C.-J., Enbody, E. D., Dobreva, M. P., Abzhanov, A., Davis, B. W., Lamichhaney, S., Pettersson, M., Sendell-Price, A. T., Grace Sprehn, C., Valle, C. A., Vasco, K., Wallerman, O., Rosemary Grant, B., Grant, P. R., & Andersson, L. (2022). Rapid adaptive radiation of Darwin's finches depends on ancestral genetic modules. Science Advances, 8(27), p.eabm5982.

Rull, V., & Carnaval, A. C. (2020). Neotropical diversification: patterns and processes. Springer.

Ryan, M. J., & Brenowitz, E. A. (1985). The role of body size, phylogeny, and ambient noise in the evolution of bird song. The American Naturalist, 126(1), 87–100.

Sanders, H. L. (1968). Marine benthic diversity: a comparative study. The American Naturalist, 102(925), 243–282.

Sasa, M. M., Chippindale, P. T., & Johnson, N. A. (1998). Patterns of postzygotic isolation in frogs. Evolution, 52(6), 1811-1820.

Seddon, N. (2005). Ecological adaptation and species recognition drives vocal evolution in neotropical suboscine birds. Evolution, 59(1), 200–215.

Seddon, N., Merrill, R. M., & Tobias, J. A. (2008). Sexually selected traits predict patterns of species richness in a diverse clade of suboscine birds. The American Naturalist, 171(5), 620–631.

Seddon, N., & Tobias, J. A. (2010). Character displacement from the receiver's perspective: Species and mate recognition despite convergent signals in suboscine birds. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 277(1693), 2475–2483.

Seehausen, O. (2006). African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 273(1597), 1987–1998.

Sersic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R., Avila, L. J., Sites Jr, J. W., & Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. Biological Journal of the Linnean Society, 103(2), 475–494.

Servedio, M. R., & Boughman, J. W. (2017). The role of sexual selection in local adaptation and speciation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 48, 85–109.

Servedio, M. R., van Doorn, G. S., Kopp, M., Frame, A. M., & Nosil, P. (2011). Magic traits in speciation:'magic'but not rare? Trends in Ecology & Evolution, 26(8), 389–397.

Short, L. L. (1969). Taxonomic aspects of avian hybridization. The Auk, 86(1), 84–105.

Sibley, C. G., & Monroe, B. L. (1990). Distribution and taxonomy of birds of the world. Yale University Press.

Slabbekoorn, H., & Smith, T. B. (2002a). Bird song, ecology and speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 357(1420), 493–503.

Slabbekoorn, H., & Smith, T. B. (2002b). Habitat-dependent song divergence in the little greenbul: an analysis of environmental selection pressures on acoustic signals. Evolution, 56(9), 1849–1858.

Slater, P. J. (2000). Birdsong repertoires: their origins and use. The origins of music. (pp.49–63).

Smith, B. T., McCormack, J. E., Cuervo, A. M., Hickerson, M., Aleixo, A., Cadena, C. D., Pérez-Emán, J., Burney, C. W., Xie, X., Harvey, M. G., & others. (2014). The drivers of tropical speciation. Nature, 515(7527), 406–409.

Sorenson, M. D., Sefc, K. M., & Payne, R. B. (2003). Speciation by host switch in brood parasitic indigobirds. Nature, 424(6951), 928–931.

Stotz, D. F., Fitzpatrick, J. W., Parker III, T. A., & Moskovits, D. K. (1996). Neotropical birds: ecology and conservation. University of Chicago Press.

Stryjewski, K. F., & Sorenson, M. D. (2017). Mosaic genome evolution in a recent and rapid avian radiation. Nature Ecology and Evolution, 1(12), 1912–1922.

Studds, C. E., & Marra, P. P. (2011). Rainfall-induced changes in food availability modify the spring departure programme of a migratory bird. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 278(1723), 3437–3443.

Sturm, R. A., & Frudakis, T. N. (2004). Eye colour: Portals into pigmentation genes and ancestry. Trends in Genetics 20(8), 327–332. Elsevier Ltd.

Thibert-Plante, X., & Hendry, A. P. (2009). Five questions on ecological speciation addressed with individual-based simulations. Journal of Evolutionary Biology, 22(1), 109–123.

Thioulouse, J., Dray, S., Dufour, A.-B., Siberchicot, A., Jombart, T., & Pavoine, S. (2018). Multivariate analysis of ecological data with ade4.

Thomas, B. T. (1996). Notes on the distribution, body mass, foods and vocal mimicry of the gray seedeater (Sporophila intermedia). *Ornitología Neotropical*, *7*, 165–169.

Tobias, J. A., Aben, J., Brumfield, R. T., Derryberry, E. P., Halfwerk, W., Slabbekoorn, H., & Seddon, N. (2010). Song divergence by sensory drive in Amazonian birds. Evolution: International Journal of Organic Evolution, 64(10), 2820–2839.

Toews, D. P. L., Taylor, S. A., Vallender, R., Brelsford, A., Butcher, B. G., Messer, P. W., & Lovette, I. J. (2016). Plumage genes and little else distinguish the genomes of hybridizing warblers. Current Biology, 26(17), 2313–2318.

Torres-Dowdall, J., & Meyer, A. (2021). Sympatric and allopatric diversification in the adaptive radiations of Midas cichlids in Nicaraguan Lakes. The behavior, ecology and evolution of cichlid fishes (pp. 175–216). Springer.

Trujillo-Arias, N., Dantas, G. P. M., Arbeláez-Cortés, E., Naoki, K., Gómez, M. I., Santos, F. R., Miyaki, C. Y., Aleixo, A., Tubaro, P. L., & Cabanne, G. S. (2017). The niche and phylogeography of a passerine reveal the history of biological diversification between the Andean and the Atlantic forests. Molecular Phylogenetics and Evolution, 112, 107–121.

Tubaro, P. L., & Lijtmaer, D. A. (2002). Hybridization patterns and the evolution of reproductive isolation in ducks. Biological Journal of the Linnean Society, 77(2), 193-200.

Turbek, S., Browne, M., Pasian, C., & di Giacomo, A. (2019). First nest description of the Iberá Seedeater (Sporophila iberaensis). Wilson Journal of Ornithology, 131, 156–160.

Turbek, S. P., Browne, M., di Giacomo, A. S., Kopuchian, C., Hochachka, W. M., Estalles, C., Lijtmaer, D. A., Tubaro, P. L., Silveira, L. F., Lovette, I. J., Safran, R. J., Taylor, S. A., & Campagna, L. (2021). Rapid speciation via the evolution of pre-mating isolation in the Iberá Seedeater. Science, 371(6536).

Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in S outh A merica. Molecular Ecology, 22(5), 1193–1213.

Turner, S. D. (2014). qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. BioRxiv.

Turner, T. L., & Hahn, M. W. (2010). Genomic islands of speciation or genomic islands and speciation? Molecular Ecology, 19(5), 848–850.

Turner, T. L., Hahn, M. W., & Nuzhdin, S. V. (2005). Genomic islands of speciation in Anopheles gambiae. PLoS Biology, 3(9), e285.

Uy, J. A. C., Cooper, E. A., Cutie, S., Concannon, M. R., Poelstra, J. W., Moyle, R. G., & Filardi, C. E. (2016). Mutations in different pigmentation genes are associated with parallel melanism in island flycatchers. Proceedings. Biological Sciences, 283(1834).

Uy, J. A. C., Moyle, R. G., Filardi, C. E., & Cheviron, Z. A. (2009). Difference in plumage color used in species recognition between incipient species is linked to a single amino acid substitution in the melanocortin-1 receptor. The American Naturalist, 174(2), 244–254.

Valderrama, E., Pérez-Emán, J. L., Brumfield, R. T., Cuervo, A. M., & Cadena, C. D. (2014). The influence of the complex topography and dynamic history of the montane Neotropics on the evolutionary differentiation of a cloud forest bird (Premnoplex brunnescens, Furnariidae). Journal of Biogeography, 41(8), 1533–1546.

Van Belleghem, S. M., Rastas, P., Papanicolaou, A., Martin, S. H., Arias, C. F., Supple, M. A., Hanly, J. J., Mallet, J., Lewis, J. J., Hines, H. M., & others. (2017). Complex modular architecture around a simple toolkit of wing pattern genes. Nature Ecology & Evolution, 1(3), 1–12.

Van Rijssel, J. C., Moser, F. N., Frei, D., & Seehausen, O. (2018). Prevalence of disruptive selection predicts extent of species differentiation in Lake Victoria cichlids. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 285(1871), 20172630.

Visser, M., Kayser, M., & Palstra, R. J. (2012). HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter. Genome Research, 22(3), 446–455.

Vizentin-Bugoni, J., Areta, J. I., di Giacomo, A. G., di Giacomo, A. S., Jacobs, F., Afonso Coimbra, M. A., & Dias, R. A. (2013). Breeding biology and conservation of the Marsh Seedeater Sporophila palustris. Bird Conservation International, 23(2), 147–158.

Wakamatsu, K., Ito, S., & Rees, J. L. (2002). The usefulness of 4-amino-3-hydroxyphenylalanine as a specific marker of pheomelanin. Pigment Cell Research, 15(3), 225–232.

Wallbank, R. W. R., Baxter, S. W., Pardo-Diaz, C., Hanly, J. J., Martin, S. H., Mallet, J., Dasmahapatra, K. K., Salazar, C., Joron, M., Nadeau, N., McMillan, W. O., & Jiggins, C. D. (2016). Evolutionary Novelty in a Butterfly Wing Pattern through Enhancer Shuffling. PLOS Biology, 14(1), e1002353.

Wang, H., Yin, H., Jiao, C., Fang, X., Wang, G., Li, G., Ni, F., Li, P., Su, P., Ge, W., et al. (2020). Sympatric speciation of wild emmer wheat driven by ecology and chromosomal rearrangements. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(11), 5955–5963.

Weir, B. S., & Basten, C. J. (1990). A biometrics invited pPaper with discussion. Sampling Strategies for Distances between DNA Sequences. Biometrics, 551–582.

Weir, J. T. (2006). Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. Evolution, 60(4), 842–855.

Weir, J. T., & Price, M. (2011). Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in Dendrocincla woodcreepers. Molecular Ecology, 20(21), 4550–4563.

West-Eberhard, M. J. (1983). Sexual selection, social competition, and speciation. Quarterly Review of Biology, 58(2), 155–183.

Whitney, J. L., Bowen, B. W., & Karl, S. A. (2018). Flickers of speciation: Sympatric colour morphs of the arc-eye hawkfish, Paracirrhites arcatus, reveal key elements of divergence with gene flow. Molecular Ecology, 27(6), 1479–1493.

Wickham, H., Chang, W., & Wickham, M. H. (2016). Package 'ggplot2'. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. Version, 2(1), 1–189.

Wilkins, M. R., Seddon, N., & Safran, R. J. (2013). Evolutionary divergence in acoustic signals: Causes and consequences. Trends in Ecology and Evolution, 28 (3), 156–166.

Wilson, D. R., Ratcliffe, L. M., & Mennill, D. J. (2016). Black-capped chickadees, Poecile atricapillus, avoid song overlapping: evidence for the acoustic interference hypothesis. Animal Behaviour, 114, 219–229.

Wilson, S. J., & Bayne, E. M. (2019). Songbird community response to regeneration of reclaimed wellsites in the boreal forest of Alberta. Journal of Ecoacoustics, 3, 1-11.

Winker, K. (2021). An overview of speciation and species limits in birds. The Auk, 138(2), ukab006.

Wolf, J. B. W., & Ellegren, H. (2017a). Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation. Nature Reviews Genetics, 18(2), 87–100.

Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., & Rieseberg, L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(33), 13875–13879.

Wu, C.-I. (2001). The genic view of the process of speciation. Journal of Evolutionary Biology, 14(6), 851–865.

Xu, Q., Liu, X., Chao, Z., Wang, K., Wang, J., Tang, Q., Luo, Y., Zheng, J., Tan, S., & Fang, M. (2019). Transcriptomic analysis of coding genes and non-coding RNAs reveals complex regulatory networks underlying the black back and white belly coat phenotype in Chinese Wuzhishan pigs. Genes, 10(3), 1–17.

Yamagishi, S., Honda, M., Eguchi, K., & Thorstrom, R. (2001). Extreme endemic radiation of the Malagasy vangas (Aves: Passeriformes). Journal of Molecular Evolution, 53(1), 39–46.

Zhang, L., Reifová, R., Halenková, Z., & Gompert, Z. (2021). How important are structural variants for speciation? Genes 12(7), 1084.

Zheng, X., Levine, D., Shen, J., Gogarten, S. M., Laurie, C., & Weir, B. S. (2012). A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. Bioinformatics, 28(24), 3326–3328.

Zhou, X., & Stephens, M. (2014). Efficient multivariate linear mixed model algorithms for genome-wide association studies. Nature Methods, 11(4), 407–409.

Zuk, M., & Kolluru, G. R. (1998). Exploitation of sexual signals by predators and parasitoids. The Quarterly Review of Biology, 73(4), 415-438.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. Methods in Ecology and Evolution, 1(1), 3–14.

APÉNDICE

CAPÍTULO II

Tabla Suplementaria 2.1: Regiones de divergencia genómica encontradas al contrastar los genomas completos de las siete especies de capuchinos del sur estudiados en este capítulo (109 individuos, 21 contrastes en total) que cumplieron con al menos uno de los dos criterios para ser consideradas picos de divergencia.

Contraste	Scaffold	Inicio ventanas	Fin ventanas	Inicio SNPs >= 0.85	Fin SNPs >=0.85	Tamaño (kb)	SNPs con *Fst*> 0.85	SNPs fijados	*Fst* promedio más alto
hypox vs ibe	430	11025001	11070000	11027576	11067689	40,113	41	0	0,23
hypox vs mel	252	465001	475000	461307	474102	12,795	21	0	0,33
	430	11025001	11045000	11026127	11047843	21,716	24	1	0,22
	1262	210001	420000	-	-	-	-	-	0,25
	1717	930001	955000	937441	948842	11,401	10	0	0,45
	1791	5001	10000	-	-	-	-	-	0,22
	1923	40001	180000	-	-	-	-	-	0,34
hypox vs nig	252	450001	485000	452406	482101	29,695	6	0	0,23
	579	75001	400000	105766	184334	78,568	3	0	0,49
	762	1675001	1685000	1675116	1693117	18,001	55	7	0,27
	3622	810001	1305000	925046	1313344	388,298	7	0	0,38
hypox vs pal	257 (b)	24415001	24470000	24429207	-	-	-	-	0,25
	1262	105001	275000	-	-	-	-	-	0,25
	1717	940001	955000	-	-	-	-	-	0,31
hypox vs pil	252	450001	495000	452723	493873	41,15	52	0	0,41
	308	90001	110000	107076	108360	1,284	5	0	0,36
	637	4460001	4530000	-	-	-	-	-	0,27
	1717	935001	960000	-	-	-	-	-	0,37
hypox vs rufi	430	11040001	11070000	11041163	11069932	28769	13	0	0,23
ibe vs mel	252	455001	475000	457501	474102	16,601	20	3	0,33
	257 (a)	21650001	24815000	21654974	21686672	31,698	18	0	0,36
	378	1840001	1895000	-	-	-	-	-	0,23
	1717	935001	955000	938281	952914	14,633	26	0	0,52
	1923	40001	180000	-	-	-	-	-	0,28
ibe vs nig	257 (a)	21660001	28705000	21661528	21692881	31,353	5	0	0,22
	430	11025001	11070000	11027082	11067987	40,905	50	0	0,32
	567	2570001	2715000	-	-	-	-	-	0,21
	579	75001	355000	147737	204849	57,112	4	1	0,59
	3622	930001	1100000	-	-	-	-	-	0,37
ibe vs pal	257 (b)	24425001	24815000	24452213	24811020	358,807	7	0	0,27

	404	5500001	5660000	5487404	5487406	0,002	2	0	0,21
	430	11025001	11070000	11027082	11067987	40,905	49	0	0,28
	1690	445001	470000	-	-	-	-	-	0,22
	1717	940001	955000	-	-	-	-	-	0,36
ibe vs pil	252	450001	460000	-	-	-	-	-	0,25
	257 (b)	24420001	28705000	-	-	-	-	-	0,27
	308	90001	110000	107076	108360	1,284	5	0	0,34
	378	1880001	1895000	-	-	-	-	-	0,23
	404 (a)	5185001	5680000	5490043	5678465	188,422	7	0	0,28
	1717	935001	955000	942606	951535	8,929	7	0	0,42
ibe vs rufi	430	11025001	11030000	11027706	11030000	2,294	18	0	0,30
mel vs nig	69	95001	265000	-	-	-	-	-	0,22
	118	7165001	7175000	7173767	7173818	0,051	2	0	0,32
	161	530001	1455000	-	-	-	-	-	0,20
	167	1365001	1455000	1386964	-	-	1	0	0,23
	252	420001	485000	422050	479024	56,974	76	39	0,65
	257 (c)	6000001	6085000	6034167	-	-	1	0	0,29
	257 (a)	21660001	21674547	14,546	-	-	14	0	0,24
	257 (b)	24420001	24425000	-	-	-	-	-	0,22
	257 (d)	28700001	28710000	-	-	-	-	-	0,25
	266	12310001	18160000	-	-	-	-	-	0,28
	308	105001	110000	107418	108347	0,929	8	0	0,52
	404 (a)	5180001	5195000	5144849	5186953	42,104	2	0	0,25
	404 (a)	5415001	5510000	5426205	5511041	84,836	8	1	0,29
	404 (b)	10780001	10810000	11128297	11256317	128,02	2	0	0,29
	412	3425001	3455000	3425221	3453466	28,245	9	1	0,22
	430	11025001	11045000	11027576	11044821	17,245	17	1	0,28
	500	80001	235000	-	-	-	-	-	0,47
	567	2690001	2720000	2710231	2717594	7,363	3	0	0,27
	579	50001	460000	147737	-	-	1	0	0,49
	762	1665001	1690000	1666833	1689934	23,101	61	14	0,37
	1717	930001	955000	-	-	-	-	-	0,52
	1875	1595001	2005000	-	-	-	-	-	0,34
	1923	60001	180000	-	-	-	-	-	0,29
	3622	930001	980000	-	-	-	-	-	0,38
	3622	1005001	1110000	1093873	1097581	3,708	3	0	0,30
mel vs pil	161	515001	535000	-	-	-	-	-	0,22
	252	420001	495000	422050	493873	71,823	121	20	0,57
	257 (a)	21670001	21675000	21670594	21674547	3,953	5	0	0,24
	308	90001	110000	-	-	-	-	-	0,37
	404	5175001	5185000	-	-	-	-	-	0,24

mel vs pal	252	425001	475000	425093	474102	49,009	32	6	0,38
	430	11025001	11045000	11027576	11044821	17,245	16	1	0,24
	1923	40001	155000	-	-	-	-	-	0,31
mel vs rufi	252	420001	475000	424921	471271	46,35	25	4	0,36
	257 (a)	21655001	24445000	21660208	21674547	14,339	14	0	0,34
	430	11025001	11030000	11027576	11030054	2,478	12	1	0,30
	579	350001	375000	-	-	-	-	-	0,24
	1635	3720001	3730000	3723260	3725209	1,949	7	0	0,31
	1717	930001	955000	934113	952914	18,801	22	0	0,51
nig vs pal	118	7165001	7175000	7171074	7173904	2,83	7	1	0,41
	252	450001	485000	480541	480925	0,384	3	0	0,30
	257 (b)	24405001	24470000	24417282	24468740	51,458	11	1	0,37
	308	105001	110000	108067	108347	0,28	6	0	0,40
	404 (a)	5215001	5540000	5219145	5537807	318,662	16	2	0,33
	412	3425001	3430000	3425221	3428910	3,689	5	1	0,21
	567	470001	625000	-	-	-	-	-	0,30
	567	2685001	2705000	2632206	2688467	56,261	3	0	0,25
	579	40001	2705000	-	-	-	-	-	0,30
nig vs pil	65	1240001	1250000	-	-	-	-	-	0,28
	69	95001	265000	-	-	-	-	-	0,26
	252	445001	505000	454524	495023	40,499	45	5	0,49
	257 (c)	6025001	6090000	-	-	-	-	-	0,36
	257 (a)	21520001	24445000	-	-	-	-	-	0,24
	308	90001	110000	90399	108360	17,961	4	0	0,29
	404 (a)	5175001	5510000	5184152	5678609	494,457	41	11	0,42
	404 (b)	10745001	10920000	10745500	10866268	120,768	8	1	0,31
	412	3405001	3475000	3405519	3431674	26,155	21	2	0,37
	500	80001	365000	-	-	-	-	-	0,44
	567	2670001	2720000	2704885	2717594	12,709	6	0	0,37
	579	50001	360001	-	-	-	-	-	0,32
	1717	935001	955000	938281	951535	13,254	6	0	0,40
	3622	930001	1100000	-	-	-	-	-	0,27
nig vs rufi	252	450001	485000	456751	482101	25,35	4	0	0,26
	308	105001	110000	107642	108302	0,66	7	0	0,43
	329	32590001	32750000						0,25
	404 (a)	5180001	5490000	5216766	5219587	2,821	5	0	0,34
	430	11040001	11085000	11042692	11079861	37,169	46	0	0,32
	637	4940001	5325000	-	-	-	-	-	0,29
	762	1675001	1690000	1667579	1689934	22,355	37	12	0,33
	1875	1990001	2000000	-	-	-	-	-	0,34
	1954	2875001	2880000	2866262	2878396	12,134	9	0	0,23

	3622	850001	1100000	806830	926838	120,008	7	0	0,36
pal vs pil	252	450001	495000	452723	493873	41,15	25	0	0,34
	308	90001	110000	107418	108360	0,942	3	1	0,33
	404 (a)	5185001	5195000	5186953	5192367	5,414	5	0	0,29
	430	11060001	11070000	11061491	11063959	2,468	6	0	0,23
pal vs rufi	257 (b)	24410001	24470000	24429207	24468740	39,533	6	0	0,31
	404 (a)	5180001	5210000	5202663	5209851	7,188	3	0	0,25
	430	11040001	11070000	11041309	11069932	28,623	39	1	0,31
	1717	940001	950000	-	-	-	-	-	0,30
pil vs rufi	252	450001	495000	452723	493873	41,15	44	1	0,37
	257 (b)	24055001	24445000	24416641	24421823	5,182	3	0	0,32
	308	90001	110000	107076	108360	1,284	4	0	0,35
	404 (a)	5175001	10810000	5649079	5649144	0,065	2	0	0,27
	567	2700001	2710000	-	-	-	-	-	0,31
	1717	940001	955000	942465	951535	9,07	6	0	0,39

*****En violeta se resaltan las regiones que comprendieron al menos dos ventanas de 5kb consecutivas con *Fst* promedios ≥ 0,2 pero que no tuvieron al menos 5 SNPs con valores individuales de *Fst* ≥ 0,85.

[$]En naranja se resaltan las regiones que tuvieron al menos 5 SNPs con valores individuales de *Fst* ≥ 0,85 pero que no comprendieron al menos dos ventanas de 5kb consecutivas con *Fst* promedios ≥ 0,2.

[#]Otros detalles como en la **Tabla 2.2**.

CAPÍTULO IV

<u>Tabla Suplementaria 4.1</u>: Grabaciones usadas para desarrollar los análisis del capítulo cuatro. Se indica el número de campo de la grabación, la especie a la que pertenece el individuo grabado, la localidad en la que se grabó el individuo y el año de grabación.

Grabación	Especie	Localidad	Año
4	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
5	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
6	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
7	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
8	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
10	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
11	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2018
12	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2018
13	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2018
14	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2018
15	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2018
16	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
19	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
21	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
23	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
26	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2018
28	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2018
29	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2018
30	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
31	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2018
38	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019
40	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019
41	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019

42	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019
43	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019
44	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019
47	*S. hypoxantha*	Esteros del Iberá	2019
49	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2019
50	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2019
51	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2019
52	*S. iberaensis*	Esteros del Iberá	2019
53	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
54	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
55	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
56	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
57	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
58	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
59	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
60	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
61	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
62	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
63	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
64	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
65	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
66	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
67	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
68	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
69	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
70	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
71	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019

73	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
74	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
76	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
77	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
78	*S. palustris*	Esteros del Iberá	2019
81	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
82	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
83	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
84	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
85	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
86	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
87	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
88	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
89	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
90	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
91	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
92	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
94	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
95	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
96	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
98	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
100	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
101	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
104	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
105	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
107	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
108	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019

109	*S. ruficollis*	Entre Ríos	2019
110	*S. palustris*	Entre Ríos	2019
111	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
112	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
113	*S. hypoxantha*	Entre Ríos	2019
116	*S. ruficollis*	Esperanza	2019
118	*S. ruficollis*	Esperanza	2019
120	*S. ruficollis*	Esperanza	2019
121	*S. ruficollis*	Esperanza	2019
122	*S. ruficollis*	Esperanza	2019
124	*S. ruficollis*	Esperanza	2019
127	*S. hypoxantha*	Mar Chiquita	2019
129	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
130	*S. hypoxantha*	Mar Chiquita	2019
133	*S. hypoxantha*	Mar Chiquita	2019
135	*S. hypoxantha*	Mar Chiquita	2019
136	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
140	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
141	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
142	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
146	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
147	*S. ruficollis*	Mar Chiquita	2019
148	*S. ruficollis*	Salta	2019
149	*S. ruficollis*	Salta	2019
151	*S. ruficollis*	Salta	2019
154	*S. ruficollis*	Salta	2019
155	*S. ruficollis*	Salta	2019

158	*S. ruficollis*	Salta	2019
159	*S. ruficollis*	Salta	2019
161	*S. ruficollis*	Salta	2019
162	*S. ruficollis*	Salta	2019
163	*S. ruficollis*	Salta	2019
165	*S. ruficollis*	Salta	2019
166	*S. ruficollis*	Salta	2019
167	*S. ruficollis*	Salta	2019
168	*S. ruficollis*	Salta	2019

***** Las grabaciones aún no cuentan con un número propio de ingreso a la Colección Nacional de Sonidos Naturales del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”.

<u>Tabla Suplementaria 4.2</u>: Modelos lineales mixtos empleados para evaluar el efecto de las especies y las poblaciones sobre los componentes principales que sintetizaron las variables acústicas medidas. Se indican las variables y los cantos explorados, las variables independientes y las variables dependientes de los modelos y la sintaxis para R de los modelos. Los modelos se seleccionaron siguiendo el criterio *AIC*.

Variables acústicas analizadas	Variable independiente	Variable dependiente	Sintaxis en R
Variables estimadas por elememto Cantos simples	**Especie**	**Comp. 1**	lme(Comp. 1 ~ Especie, random= ~1 | Individuo, dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Especie,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Especie,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
	Población	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
Variables estimadas por elememto Cantos complejos	**Especie**	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Especie,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Especie,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Especie,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1, Canción=~1), weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 4	lme(Comp. 4~ Especie,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
	Población	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Población,random=list(Individuo=~1, Canción=~1), weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 4	lme(Comp. 4~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
Variables estimadas por canto Cantos simples	**Especie**	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Especie,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), data=dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Especie,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Especie,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
	Población	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Población,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Población,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Población,random=list(Localidad=~1, Individuo=~1), weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset
Variables estimadas por canto Cantos complejos	**Especie**	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Especie,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Especie,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Especie,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Especie), data=dataset)
	Población	**Comp. 1**	lme(Comp. 1~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 2	lme(Comp. 2~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)
		Comp. 3	lme(Comp. 3~ Población,random= ~1 | Individuo, weights=varIdent(form = ~1|Población), data=dataset)

Tabla Suplementaria 4.3: Modelos lineales mixtos empleados para evaluar el efecto de la homo o la heteroespecificidad y del estado de las poblaciones sobre el solapamiento promedio de los espacios acústicos. Para cada dataset se indica la sintaxis para R del modelo elegido de acuerdo con el criterio *AIC*.

Dataset usado	Sintaxis en R
Variables acústicas elementales Cantos simples	lm(Prop. solapamiento ~ Especie*Estado, weights= varIdent(form = ~1|Especie), dataset)
Variables acusticas elementales Cantos complejos	lm(Prop. solapamiento ~ Especie*Estado, dataset)
Variables acústicas por canción Cantos simples	lm(Prop. solapamiento ~ Especie*Estado, weights= varIdent(form = ~1|Especie), dataset)
Variables acústicas por canción Cantos complejos	

Tabla Suplementaria 4.4: Correlación de las variables acústicas elementales con los componentes principales retenidos. Se indican los valores de correlación de las variables y los PCs para cantos simples y cantos complejos. Los casos de alta correlación se destacan en negrita y cursiva.

Cantos simples								
PC1	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,53	0,51	0,42	***0,86***	***0,78***	***0,96***	***0,84***	***0,89***
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	0,91	-0,60	***0,71***	-0,49	***0,94***	0,39	***0,82***	***0,82***
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,43	0,30	-0,51	-0,39	0,22	***0,72***	0,29	***0,89***
PC2	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,68	***0,76***	***0,65***	-0,25	-0,28	-0,18	-0,05	-0,02
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	-0,23	0,46	-0,34	-0,25	-0,17	0,30	0,10	0,08
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,78	***0,66***	0,22	0,21	-0,06	0,00	0,06	-0,23
PC3	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,27	0,05	-0,02	0,39	0,50	0,15	-0,26	-0,28
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	0,27	0,13	0,46	0,25	0,17	-0,20	-0,24	-0,34
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,18	0,22	***0,51***	***0,51***	0,04	-0,50	***-0,54***	0,31
Cantos complejos								
PC1	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,12	0,24	0,25	0,44	0,18	***0,90***	***0,75***	***0,86***
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	0,59	-0,17	0,23	-0,66	***0,77***	0,61	***0,82***	***0,81***
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,18	0,10	-0,02	0,02	0,32	0,63	0,57	0,52
PC2	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,02	0,07	0,04	***-0,85***	***-0,93***	-0,33	0,28	0,36
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	-0,68	-0,08	***-0,85***	-0,32	-0,45	0,28	0,30	0,42
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,02	-0,04	-0,20	-0,16	0,22	0,47	0,48	***-0,71***
PC3	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,94	***0,91***	***0,79***	-0,08	0,00	-0,10	-0,10	-0,12
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	-0,07	0,23	-0,12	-0,13	0,11	0,14	-0,14	-0,13
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,93	***0,89***	0,09	0,08	-0,64	-0,10	-0,12	-0,12
PC4	**Delta Time s**	**Dur 90 s**	**IQR Dur s**	**Q1 Freq Hz**	**Freq 5 Hz**	**Freq 95 Hz**	**IQR BW Hz**	**BW 90 Hz**
	0,08	0,06	0,09	0,06	0,03	0,02	0,11	0,00
	Peak Freq Hz	**PFC Avg Slope Hz ms**	**PFC Min Freq Hz**	**PFC Min Slope Hz ms**	**PFC Max Freq Hz**	**PFC Max Slope Hz ms**	**sd**	**freq IQR**
	0,12	-0,25	0,07	0,23	0,03	-0,28	-0,31	-0,14
	time median	**time Q25**	**skew**	**kurt**	**time ent**	**entropy**	**sfm**	**meanpeakf**
	0,06	0,06	***-0,94***	***-0,91***	0,01	0,41	0,06	0,11

<u>Tabla Suplementaria 4.5</u>: Correlación de las variables acústicas estimadas por canto con los componentes principales retenidos. Detalles como en la **Tabla Suplementaria 4.4**.

				Cantos simples					
PC1	**meanpeakf**	**num elems**	**durac elem**	**rang frec**	**durac canto**	**tasa canto**	**durac interv**	**rang frec Min5 Max95**	**mst**
	0,11	***0,74***	0,24	0,52	***0,88***	***-0,79***	0,41	***0,73***	***0,76***
PC2	**meanpeakf**	**num elems**	**durac elem**	**rang frec**	**durac canto**	**tasa canto**	**durac interv**	**rang frec Min5 Max95**	**mst**
	0,27	0,24	-0,48	0,41	-0,27	0,52	***-0,68***	0,50	0,34
PC3	**meanpeakf**	**num elems**	**durac elem**	**rang frec**	**durac canto**	**tasa canto**	**durac interv**	**rang frec Min5 Max95**	**mst**
	0,72	-0,36	0,59	0,61	-0,11	-0,03	0,00	0,01	-0,28
				Cantos complejos					
PC1	**meanpeakf**	**num elems**	**durac elem**	**rang frec**	**durac canto**	**tasa canto**	**durac interv**	**rang frec Min5 Max95**	**mst**
	0,34	***0,90***	-0,41	***0,69***	***0,88***	-0,06	-0,07	***0,84***	***0,93***
PC2	**meanpeakf**	**num elems**	**durac elem**	**rang frec**	**durac canto**	**tasa canto**	**durac interv**	**rang frec Min5 Max95**	**mst**
	0,20	0,03	***0,67***	-0,11	0,21	***-0,95***	***0,84***	0,01	0,07
PC3	**meanpeakf**	**num elems**	**durac elem**	**rang frec**	**durac canto**	**tasa canto**	**durac interv**	**rang frec Min5 Max95**	**mst**
	0,86	-0,23	-0,25	0,11	-0,23	0,05	0,14	0,09	-0,13

Tabla Suplementaria 4.6: Resultados de los modelos lineales mixtos en torno al efecto de la especie y la coexistencia geográfica (simpatría vs alopatría) sobre el solapamiento de los espacios acústicos de los cantos simples y complejos. Los resultados se muestran tanto para los espacios acústicos construidos a partir de variables acústicas estimadas por elemento y de variables acústicas estimadas por canto. Los modelos empleados se detallan en la **Tabla Suplementaria 4.3**.

Cantos simples								
	Variables acústicas estimadas por elemento				**Variables acústicas estimadas por canto**			
Solap. EA.	**Est.**	**SE**	***t***	***p***	**Est.**	**SE**	***t***	***p***
Intercepto	0,26	0,03	9,56	4,89E-11	0,11	0,03	3,52	0,001
Coexistencia geográfica	0,04	0,06	-0,59	0,56	0,03	0,07	-0,41	0,69
Especie	0,22	0,05	4,31	***0,0001***	0,12	0,06	2,17	***0,04***
valor global de p	***p = 0,0003***				***p =* 0,08**			
Cantos complejos								
	Variables acústicas estimadas por elemento				**Variables acústicas estimadas por canto**			
Solap. EA.	**Est.**	**SE**	***t***	***p***	**Est.**	**SE**	***t***	***p***
Intercepto	0,60	0,02	26,60	6,68E-16	0,26	0,04	6,46	4,5E-06
Coexistencia geográfica	0,05	0,05	1,02	0,32	0,00	0,08	0,05	0,96
Especie	0,02	0,05	0,365	0,72	0,04	0,08	0,55	0,59
valor global de p	***p* = 0,6**				***p* = 0,9**			

Tabla Suplementaria 4.7: Efecto de la especificidad y del estado de las poblaciones sobre el solapamiento de sus espacios acústicos construidos a partir de cantos simples y de cantos complejos. Contrastes pos-hoc de Tukey de los distintos tipos de poblaciones luego de aplicar los modelos lineales mixtos que mejor ajustaron. Se indica la estimación de la diferencia estadística (Est.), el error estándar de dicha estimación (SE) y la significancia estadística de la misma (*p*). Al final de la tabla se señala el *p* valor global que arrojó el modelo en torno al efecto de la interacción de la especificidad y del estado de las poblaciones sobre el solapamiento del espacio acústico (ver modelos en **Tabla Suplementaria 4.3**).

Contraste		**Variables acústicas estimadas**			**Variables acústicas estimadas**		
		Estimación	**SE**	***p***	**Estimación**	**SE**	***p***
Heteroespecísficas-Alopatrícas	**Homoespecíficas-Alopatrícas**	-0,12	0,05	0,11	-0,22	0,04	***<,0001***
Heteroespecísficas-Alopatrícas	**Heteroespecísficas-Simpatrícas**	0,03	0,06	0,97	0,04	0,07	0,9456
Heteroespecísficas-Alopatrícas	**Homoespecíficas-Simpatrícas**	-0,89	0,05	***<,0001***	-0,74	0,04	***<,0001***
Homoespecíficas-Alopatrícas	**Heteroespecísficas-Simpatrícas**	0,15	0,07	0,16	0,25	0,06	***0,0026***
Homoespecíficas-Alopatrícas	**Homoespecíficas-Simpatrícas**	-0,77	0,06	***<,0001***	-0,52	0,03	***<,0001***
Heteroespecísficas-Simpatricas	**Homoespecíficas-Simpatrícas**	-0,92	0,07	***<,0001***	-0,78	0,06	***<,0001***
***p* valor global**		***<,0001***			***<,0001***		
Cantos complejos							
Contraste		**Variables acústicas estimadas por canto**			**Variables acústicas estimadas por elemento**		
		Estimación	**SE**	***p***	**Estimación**	**SE**	***p***
Heteroespecísficas-Alopatrícas	**Homoespecíficas-Alopatrícas**	-0,04	0,05	0,83	-0,02	0,04	0,9794
Heteroespecísficas-Alopatrícas	**Heteroespecísficas-Simpatrícas**	0,00	0,09	1,00	-0,05	0,04	0,5921
Heteroespecísficas-Alopatrícas	**Homoespecíficas-Simpatrícas**	-0,74	0,05	***<,0001***	-0,40	0,03	***<,0001***
Homoespecíficas-Alopatrícas	**Heteroespecísficas-Simpatrícas**	0,04	0,08	0,96	-0,04	0,05	0,8926
Homoespecíficas-Alopatrícas	**Homoespecíficas-Simpatrícas**	-0,70	0,04	***<,0001***	-0,39	0,04	***<,0001***
Heteroespecísficas-Simpatricas	**Homoespecíficas-Simpatrícas**	-0,74	0,08	***<,0001***	-0,35	0,04	***<,0001***
***p* valor global**		***<,0001***			***<,0001***		

<u>Tabla Suplementaria 4.8</u>: Relación entre la distancia geográfica de las poblaciones y el solapamiento del espacio acústico de las mismas. Para cantos simples y complejos se muestran los resultados de las pruebas de Mantel en las que se contrastó la distancia geográfica de las poblaciones de capuchinos del sur estudiadas y el solapamiento sus espacios acústicos. Las relaciones se indican con el valor de *r* y la significancia de estas con el valor de *p*.

Dataset		*r*	*p*
Cantos simples	**Variables acusticas estimadas por elemento**	-0,18	0,75
	Variables acusticas estimadas por canto	-0,21	0,87
Cantos complejos	**Variables acusticas estimadas por elemento**	0,38	0,16
	Variables acusticas estimadas por canto	0,55	0,11

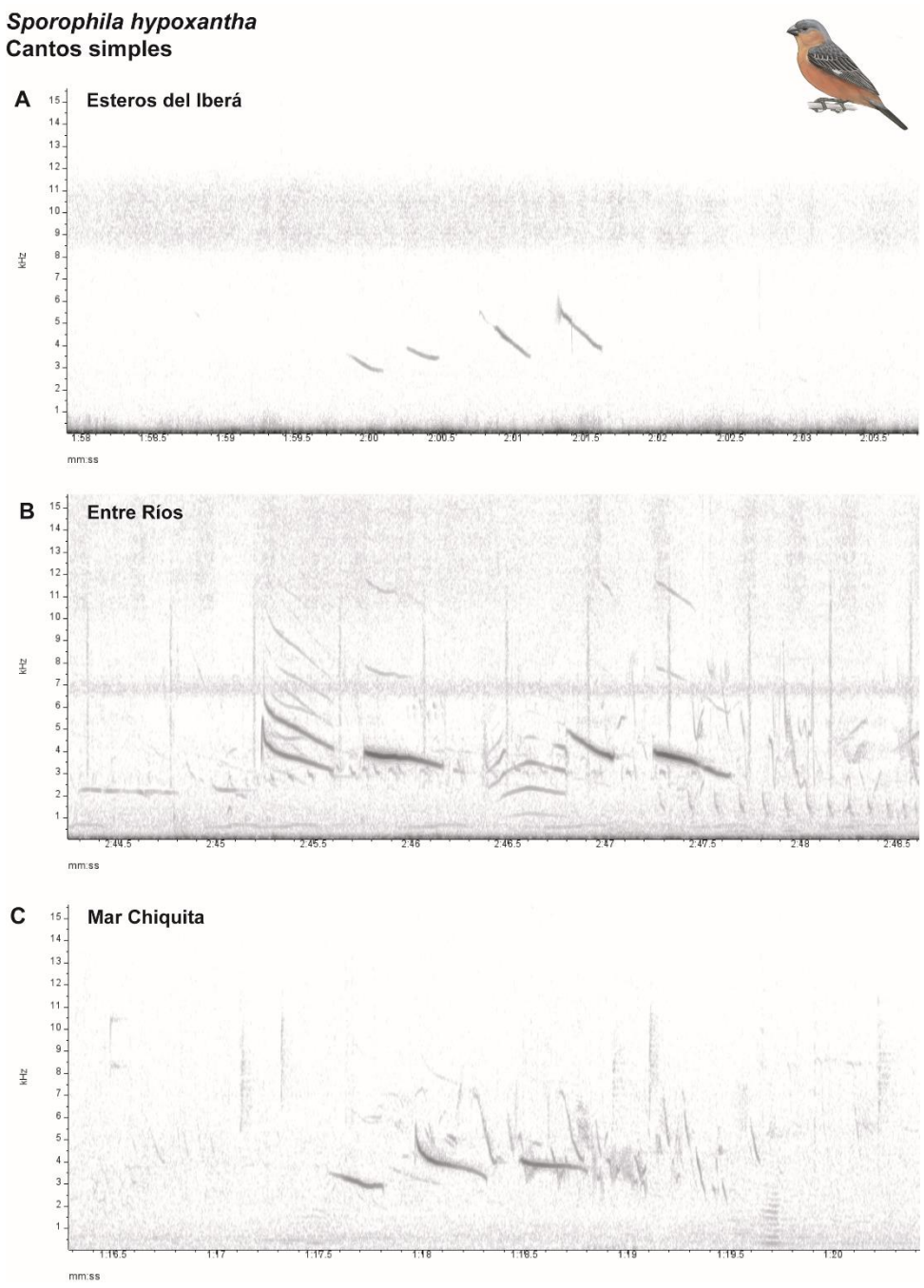


Figura Suplementaria 4.1: Cantos simples de *S. hypoxantha*. Espectrogramas con la sintaxis típica de los cantos simples de las poblaciones de *S. hypoxantha* muestreadas en: **(A)** Esteros del Iberá (Corrientes), **(B)** Entre Ríos y **(C)** Mar Chiquita (Córdoba).

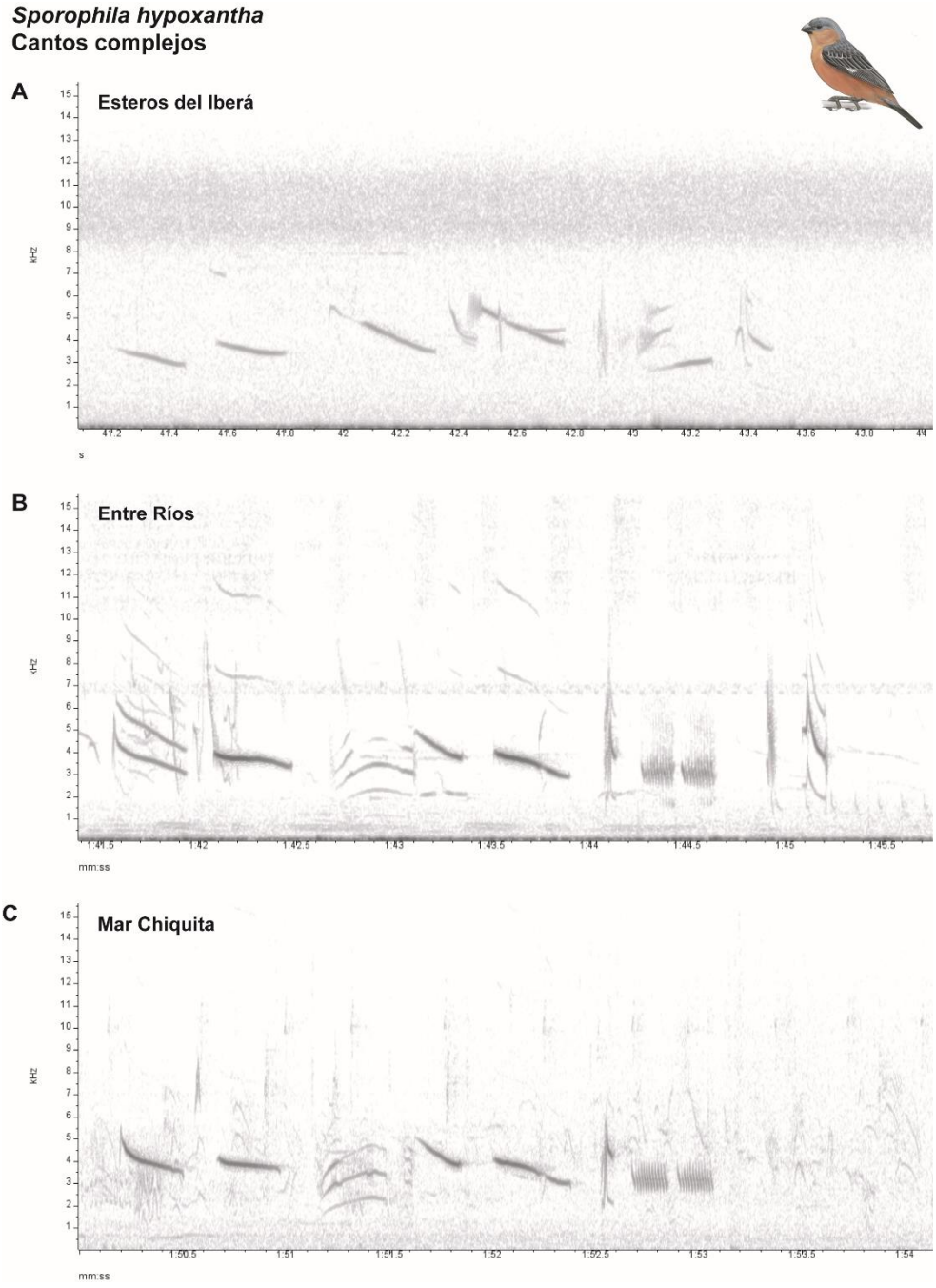
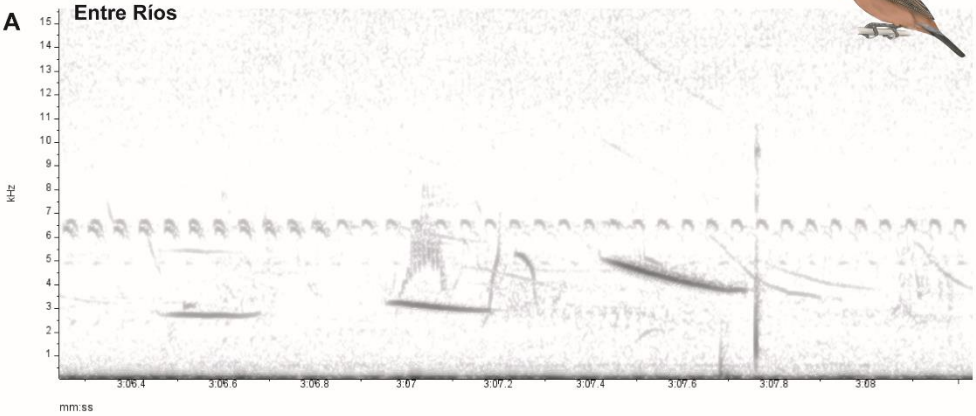


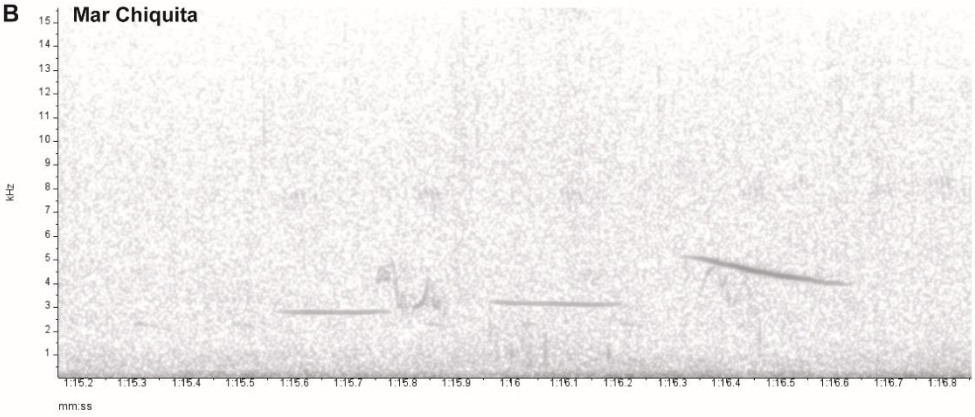
Figura Suplementaria 4.2: Cantos complejos de *S. hypoxantha*. Se muestran espectrogramas con la sintaxis típica de los cantos complejos de las poblaciones de *S. hypoxantha* muestreadas en **(A)** Esteros del Iberá (Corrientes), **(B)** Entre Ríos y **(C)** Mar Chiquita (Córdoba).

Sporophila ruficollis
Cantos simples

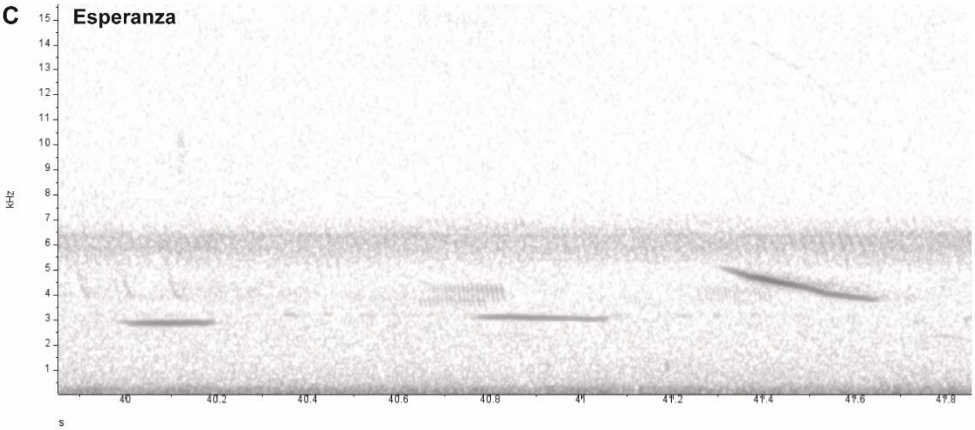
A **Entre Ríos**



B **Mar Chiquita**



C **Esperanza**



D **Salta**

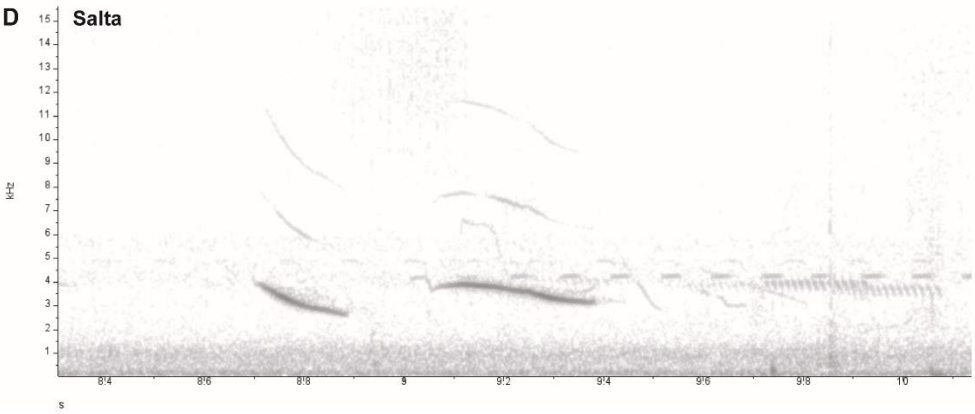


Figura Suplementaria 4.3: Cantos simples de *S. ruficollis*. Espectrogramas con la sintaxis típica de los cantos simples de las poblaciones de *S. ruficollis* muestreadas en: **(A)** Entre Ríos; **(B)** Mar Chiquita (Córdoba), **(C)** Esperanza (Santa Fe) y **(D)** Salta.

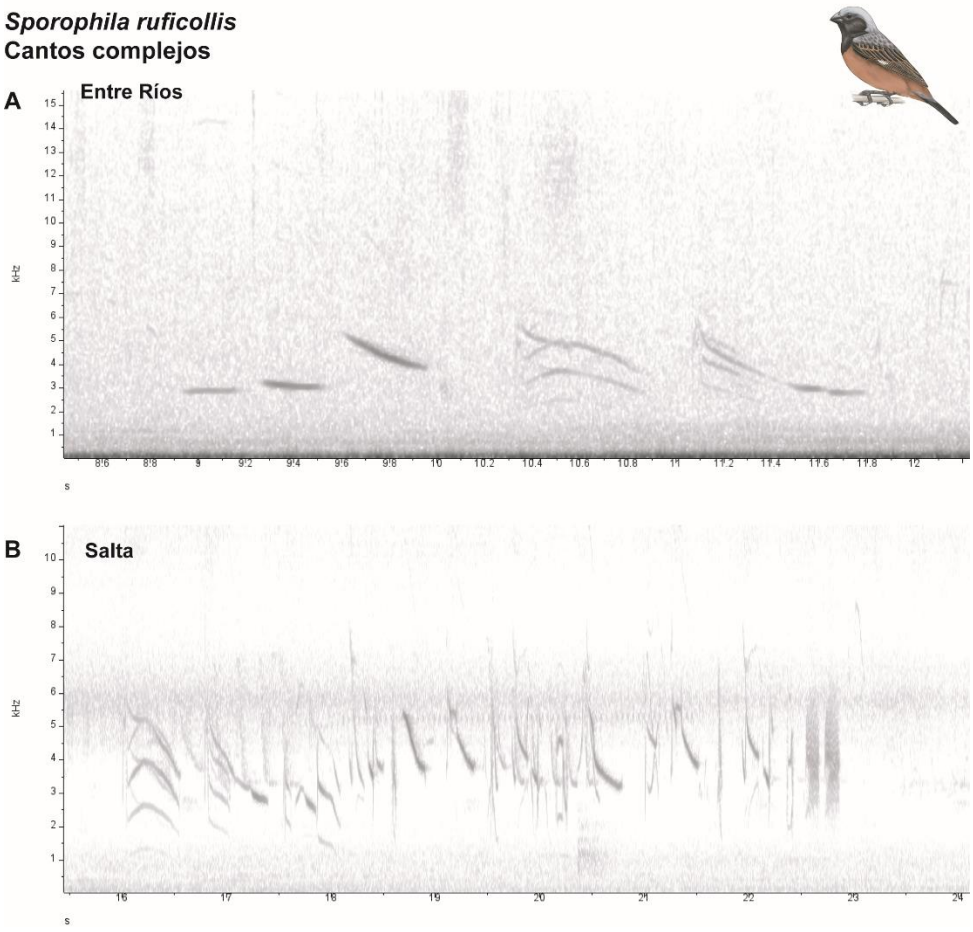
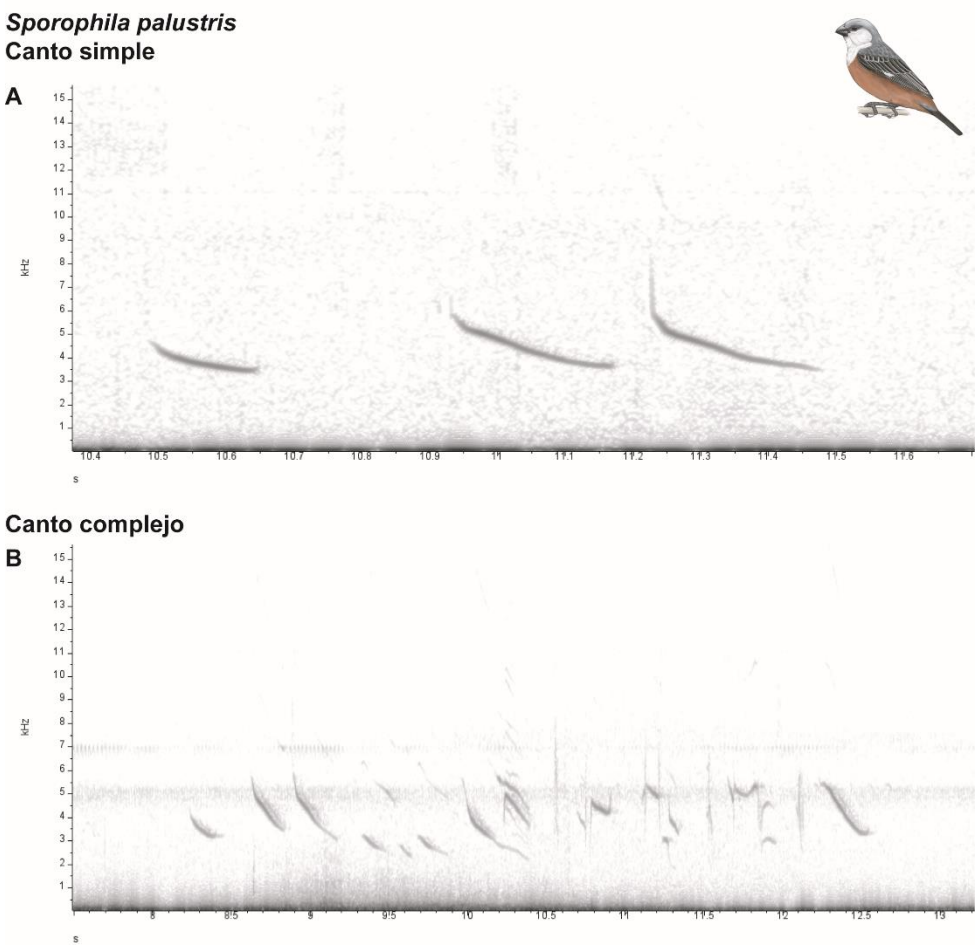


Figura Suplementaria 4.4: Cantos complejos de *S. ruficollis*. Espectrogramas con la sintaxis típica de los cantos complejos de las poblaciones de *S. ruficollis* muestreadas en: **(A)** Entre Ríos y **(B**) Salta.



<u>Figura Suplementaria 4.5</u>: Cantos simples y complejos de *S. palustris*. Espectrogramas con la sintaxis típica de cantos simples **(A)** y complejos **(B)**de la población de *S. palustris* de Entre Ríos.

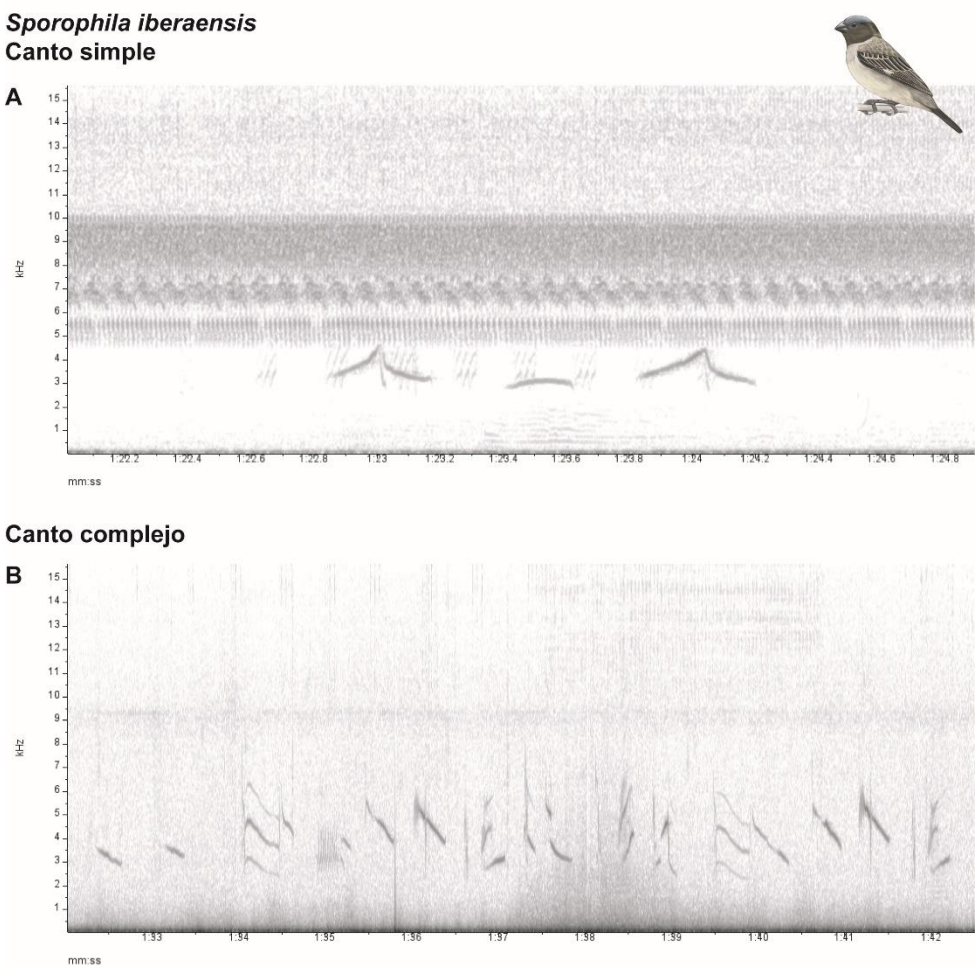
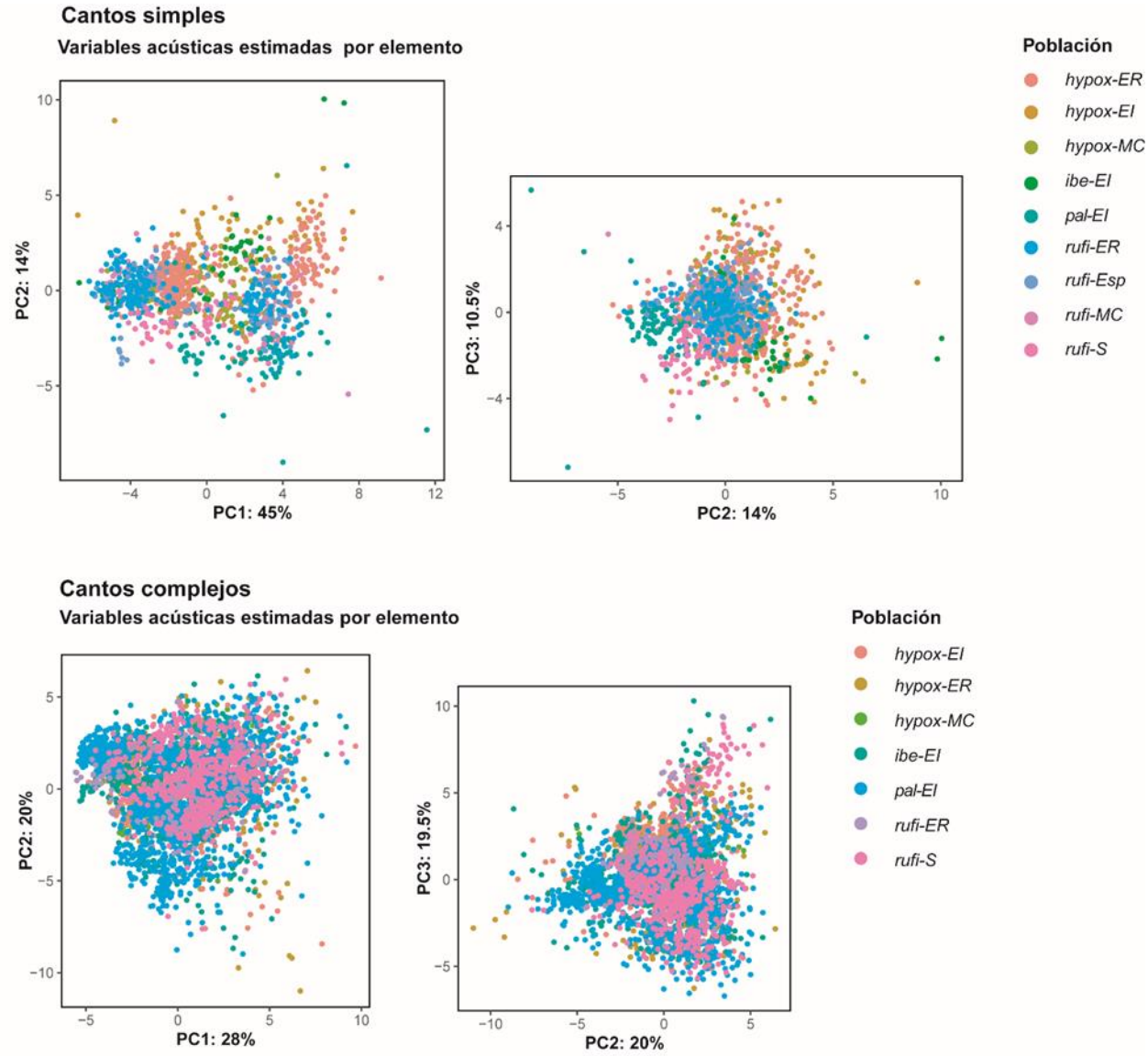


Figura Suplementaria 4.5: Cantos simples y complejos de *S. iberaensis*. Espectrogramas con la sintaxis típica de cantos simples **(A)** y complejos **(B)**de la población de *S. iberaensis* de Esteros del Iberá (Corrientes).



<u>Figura Suplementaria 4.7</u>: Representación gráfica de los espacios acústicos comprendidos entre los componentes principales retenidos para cantos simples y complejos. Se muestran los espacios construidos en base a variables acústicas estimadas por elemento. Los distintos colores representan las poblaciones de capuchinos del sur estudiadas en este capítulo (ver leyenda referencial). Las abreviaturas para hacer referencia a las poblaciones se detallan en la **Sección 4.8**.