

UCH - FC
Mag - EBE
J'694
C.1

VARIACIÓN FISIOLÓGICA Y DE ATRIBUTOS DE HISTORIA DE
VIDA EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA Y PROCEDENCIA
GEOGRÁFICA EN POBLACIONES CHILENAS DE *Bufo spinulosus*
(ANURA: BUFONIDAE)

Tesis

Entregada a La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Ecología
y Biología Evolutiva



Facultad de Ciencias

Por

Paulina Andrea Jiménez Huidobro

Diciembre, 2008

Director de Tesis: Dr. Marco Méndez T.

Dr. Michel Sallaberry A.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

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

PAULINA JIMÉNEZ HUIDOBRO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 10 de diciembre de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Marco Méndez T.....

Co-director de Tesis:

Dr. Michel Sallaberry A.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Prof. Alberto Veloso.....

Prof. Mauricio Canals.....



*Dedicada a mis padres, a mi compañero, a mis amigos y a mis
maestros... y muy especialmente a la memoria de Leontina A. C.*



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis maestros: al Dr. Marco Méndez por su constante apoyo y profunda confianza en mi trabajo, y al Dr. Michel Sallaberry por su apoyo, enseñanzas y profunda amistad. A las personas que trabajaron en el laboratorio de Zoología de la Universidad de Chile, que sin ellos no habría sido posible esta tesis: Marcela Márquez, Javiera Cisternas, Marjorie Correa, Hugo Salinas, Carlos Pino y especialmente a Eduardo Soto por su profunda amistad y sus enseñanzas acerca de la biología de los anfibios. Agradezco a la comisión evaluadora formada por los profesores Alberto Veloso y Mauricio Canals, por sus valiosas críticas y sugerencias a mi proyecto de tesis.

Agradezco especialmente a mi familia: a mi madre, mi padre y mis hermanos por apoyarme en todas las actividades de mi vida, incluso en las más incomprensibles. A mis amigas de pregrado y postgrado por su apoyo y ayuda siempre brindada. Finalmente agradezco a mi compañero, Cristián, por su apoyo, paciencia y constante ánimo, sin el cual no habría terminado esta tesis.



ÍNDICE



Lista de tablas	v
Lista de Figuras	vi
Resumen	ix
Abstract.....	xi
Introducción	1
Materiales y Métodos	4
Resultados	8
Discusión	12
Tablas	20
Figuras	22
Bibliografía	35

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1: Caracterización y comparación de las tres localidades involucradas, El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones, correspondientes a ambientes contrastantes a nivel de temperatura del agua y desecación de las pozas.
- Tabla 2: Esquema de los cruzamientos dirigidos en adultos de *Bufo spinulosus*, para la creación de familias de medios-hermanos.
- Tabla 3: Promedios, máximos, mínimos y coeficientes de variación para la distancia de salto máximo y cinco caracteres morfológicos: tamaño corporal (SVL), largo fémur, largo tibio-fibula y largo tarso-metatarso.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa de las tres localidades de estudio de *Bufo spinulosus*: El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones.

- Figura 2: Metodología empleada para medir el desempeño locomotor de larvas, como tiempo de nado en segundos.

- Figura 3: Metodología utilizada para la medición de desempeño locomotor de postmetamórficos, medida como distancia de salto máximo.

- Figura 4: Mediciones morfológicas en postmetamórficos de *Bufo spinulosus*: tamaño corporal o SVL, largo del fémur, largo de la tibio-fíbula, y largo del tarso-metatarso incluyendo falanges, y largo de la extremidad posterior completa como la sumatoria de los tres segmentos.

- Figura 5: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el tamaño corporal (SVL) a la metamorfosis de individuos de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones, desarrollados a 20°C y 25°C.

- Figura 6: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el tiempo a la metamorfosis de individuos de *Bufo spinulosus* provenientes de los dos tratamientos de temperatura y de las tres localidades de estudio.

- Figura 7: Efecto de la temperatura y la localidad sobre la tasa de crecimiento de postmetamórficos sometidos a dos temperaturas: 20°C y 25°C, provenientes de las tres localidades de estudio.

- Figura 8: Efecto de la temperatura y la localidad en el tiempo de nado (segundos) de larvas de *Bufo spinulosus* sometidos a dos temperaturas: 20°C y 25°C, provenientes de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones.

- Figura 9: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el tiempo de nado, medido en segundos, de las larvas provenientes de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones. Se corrigió por el largo antero-posterior de la larva.

- Figura 10: Efecto de la temperatura y la localidad en la distancia de salto máximo de postmetamórficos de *Bufo spinulosus* provenientes de las tres localidades de estudio, sometidas a dos temperaturas. Se muestra la distancia de salto máximo promedio para cada tratamiento, con barras de error.

- Figura 11: Efecto de la localidad sobre la distancia de salto máximo, medido en centímetros, de postmetamórficos de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones. Se corrigió por el largo de la tibio-fíbula.

- Figura 12: Efecto de la temperatura y la localidad en el largo de la tibio-fíbula (mm), corregido por tamaño corporal para postmetamórficos de *Bufo spinulosus* provenientes de las tres localidades de estudio y de los dos tratamientos de temperatura.

- Figura 13: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el largo de la tibio-fíbula de los postmetamórficos provenientes de las tres localidades de estudio. Se corrigió por tamaño corporal.

RESUMEN

En este estudio se abordó el problema de la variación del ambiente térmico y sus consecuencias a nivel morfológico y fisiológico en larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de tres localidades de Chile que presentan diferentes ambientes térmicos en las pozas donde se desarrollan: El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones. A través de experimentos de jardín común, se evaluó el efecto de la temperatura y la procedencia geográfica sobre los siguientes atributos de historia de vida: tiempo a la metamorfosis, tamaño a la metamorfosis y tasa de crecimiento. Además, se evaluó como afecta la variación de los atributos de historia de vida en el desempeño locomotor de larvas y postmetamórficos. Los resultados mostraron que las larvas de El Tatio metamorfosearon a un mayor tamaño y a una edad mayor. Las larvas de Farellones presentaron una tasa de crecimiento mayor a las dos temperaturas evaluadas, mostrando, además, una mayor velocidad de nado. Los resultados de los postmetamórficos mostraron que, tanto la temperatura como el origen geográfico, inducen alometrias en las extremidades posteriores, sin embargo, éstas no afectaron la capacidad de salto, rasgo en el cual las diferencias estuvieron explicadas sólo por la procedencia geográfica. No se encontró correlación entre el desempeño de nado de larvas y de salto de postmetamórficos. Tampoco se encontró correlación entre los atributos de historia de vida y el desempeño locomotor, tanto de larvas como de postmetamórficos. Los resultados de este estudio sugieren adaptación local por parte de estas poblaciones a sus respectivos regimenes térmicos. A partir de estos resultados se propone que el ambiente térmico larval produce cambios en rasgos como tiempo a la metamorfosis y tasa de crecimiento, mientras que el tamaño corporal sólo fue determinado por la localidad. Se sugiere que estos rasgos

morfológicos y fisiológicos son fuertemente dependientes de factores locales, mientras que los rasgos como edad y tiempo a la metamorfosis, presentaron una dependencia de la temperatura y de la localidad, mostrando variación fenotípica.

ABSTRACT

In this study, the problem of the variation of the thermal environment and his consequences at the morphological and physiological level was assessed in *Bufo spinulosus* tadpoles from three Chilean locations that present different thermal environments in the ponds the develop: El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones. Using common garden experiments, the effects of temperature and geographical origin over life history traits was evaluated: time to metamorphosis, size at metamorphosis and growth rate. It was also evaluated how the variation on the life history traits affect the locomotor performance of larvae and postmetamorphics. The results showed that tadpoles from El Tatio metamorphose at a higher size and a higher time, and that larvae from Farellones metamorphose at a higher growing rate at the two temperatures, showing also, a higher velocity of swimming. The results of the postmetamorphics showed that both temperature and geographical origin induce allometries in the posterior hindlimbs, but without affecting the jump capacity, in witch the differences were only explained by the geographical origin. No correlation was found between the swimming performance of larvae and the jump capacity of postmetamorphics. The results in this study suggest a local adaptation of the population to their respective thermal regimes. From these results it is propose that the thermal environment of tadpoles produce in traits like time to metamorphosis and growing rate, while the body size was only determinated by geographic origin. I suggest these morphological and physiological traits are strongly dependant on local factors, while traits like age to metamorphosis and growth rate present a variation with temperature and geographical origin, showing phenotypic variation.

INTRODUCCIÓN

La adaptación local de rasgos de historia de vida a nuevas condiciones ambientales ha sido descrita como una de las fuerzas evolutivas que causan divergencia y especiación (Orr y Smith, 1998; Schluter, 2001; Dieckmann *et al*, 2004). Un paradigma central en evolución es que la selección natural, actuando sobre la variación fenotípica, promovería diferenciación en poblaciones que habitan ambientes diferentes. (Linhart y Grant, 1996). Una respuesta adaptativa de las poblaciones en ambientes heterogéneos es la plasticidad fenotípica (Pigliucci, 1999), definida como la capacidad de un genotipo de generar diferentes fenotipos en ambientes contrastantes. En especies con ciclos de vida complejos, la edad y el tamaño a la metamorfosis son altamente plásticos dependiendo del ambiente de desarrollo (Volker *et al*, 2007; Sinsch *et al*, 2007).

Los cambios de estrategias de historia de vida pueden estar influenciados por la diversidad de hábitat (Pigliucci *et al*, 1999; Bonnet y Chippindale, 2004). Atkinson (1996) sugiere para ectotermos que habría un efecto de la temperatura sobre el desarrollo larval y la morfología, donde a mayor temperatura la tasa de crecimiento aumentaría y la metamorfosis se alcanzaría con un menor tamaño corporal. Se ha postulado que los factores que afectan el desarrollo larval pueden determinar algunas características relevantes de los adultos, como el tamaño corporal y sus consecuencias en la historia de vida (Duellman y Trueb 1994; Wolf *et al*, 1998). Para anfibios se ha reportado que en pozas de agua con mayor temperatura se

induciría una metamorfosis más rápida, pero con menor tamaño corporal, el cual podría determinar el tamaño del adulto. Este fenómeno se ha reportado en *Rana sylvatica* (Berven, 1990), *Rana cascade* (Blouin y Brown, 2000), *Desmognathus quadramaculatus* (Camp *et al*, 2000), y *Discoglossus galganoi* (Álvarez y Nicieza, 2002).

En anfibios la plasticidad inducida por la temperatura durante el desarrollo y el crecimiento también puede producir cambios en el desempeño de nado (Parichy y Kaplan, 1995; Ultsch *et al*, 1999; Wilson y Franklin, 1999; Wilson *et al*, 2000). Este rasgo fisiológico se puede encontrar correlacionado con la morfología del individuo, como sucede en *Rana sylvatica*, donde se observó que la temperatura de desarrollo puede determinar el tamaño y velocidad de nado de la larva (Watkins *et al*, 2004), sugiriendo que una larva de mayor tamaño nada a mayor velocidad.

Es sabido que la historia de crecimiento larval puede determinar variaciones alométricas en las extremidades posteriores de los postmetamórficos. Lutz y Rome (1994) sugieren que algunos ambientes larvales, como la temperatura, inducen alometrías en los músculos extensores, abductores e iliosacral, afectando la capacidad de salto en anuros. Se han propuesto modificaciones estructurales para el salto: extremidad posterior larga para aumentar la distancia a través de la cual la fuerza actúa, y musculatura propulsiva larga del fémur y de la tibio-fíbula para incrementar la energía del salto (Emerson, 1991). Modelos biomecánicos predicen que el tamaño corporal tiene relación directa con el desempeño de salto, es decir, un animal grande dará saltos de mayor distancia (Emerson, 1978, 1991; John-Alder y Morin, 1990; Miller *et al*, 1993; Tejedo *et al*, 2000; Wilson *et al*. 2000; Álvarez y Nicieza, 2002). Por otra parte, el largo de la tibio-fíbula es un rasgo fuertemente

asociado con la capacidad de salto, como sucede en *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, *Rana esculenta* y *Rana latastei*, donde una tibio-fíbula mas larga se relacionó positivamente con una mayor distancia de salto (Zug, 1972; Preest y Pough, 1989; Sinsch, 1994; Tejedo *et al*, 2000; Ficetola y De Bernardi, 2006). Watkins (2001) realizó experimentos de desempeño locomotor de larvas y postmetamórficos, y encontró que no existe una correlación entre la velocidad de nado de larvas y la capacidad de salto de postmetamórficos, pero si en el tamaño corporal, sugiriendo que sería un rasgo canalizado. Este resultado esta acorde a lo propuesto por Navas (2008), quien plantea que los procesos fisiológicos involucrados en el nado y el salto no son los mismos, y por lo tanto, no habría dependencia entre estos desempeños.

Hasta la fecha se han realizado estudios tanto de historia de vida, como de desempeño locomotor en anfibios, y solo un trabajo ha correlacionado el desempeño locomotor de la larva con el postmetamórfico (Watkins, 2001). Sin embargo, estos trabajos no han tratado la problemática de la variación geográfica. En este estudio evaluamos la variación de atributos de historia de vida y de desempeño locomotor en función de la temperatura y la procedencia geográfica, en larvas y postmetamórficos de *Bufo spinulosus* de tres localidades de Chile, que presentan distintos ambientes larvales a nivel de temperatura de las pozas. Predecimos que la tasa de desarrollo, la edad y el tamaño a la metamorfosis variarán en función de la temperatura y la procedencia geográfica, y las larvas provenientes de ambientes con menor temperatura tendrán un tamaño a la metamorfosis y desempeño locomotor mayores.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESPECIE DE ESTUDIO Y POBLACIONES

Bufo spinulosus Wiegmann, 1835 (Anura: Bufonidae) presenta una amplia distribución en Chile (18° a 33° S). Su tolerancia al estrés hídrico le permite habitar desde los 1000 hasta los 4600 msnm (Veloso *et al*, 1982; Ruiz *et al*, 1989). Se han descrito diferencias en un gradiente altitudinal y latitudinal en el período reproductivo (Veloso *et al*, 1982), en la disponibilidad de alimento y en la temperatura del agua de las pozas (Núñez *et al*, 1982). En términos morfológicos existe una alta variabilidad asociada a la procedencia geográfica (Méndez *et al*, 2004). En este mismo trabajo encontraron que existen tres grupos diferenciados, correspondientes a las regiones I y XV (17-21°S), II región (21-25°S) y Chile central (30-45°S). Las localidades involucradas en este estudio corresponden a El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones (Fig. 1, Tabla 1).

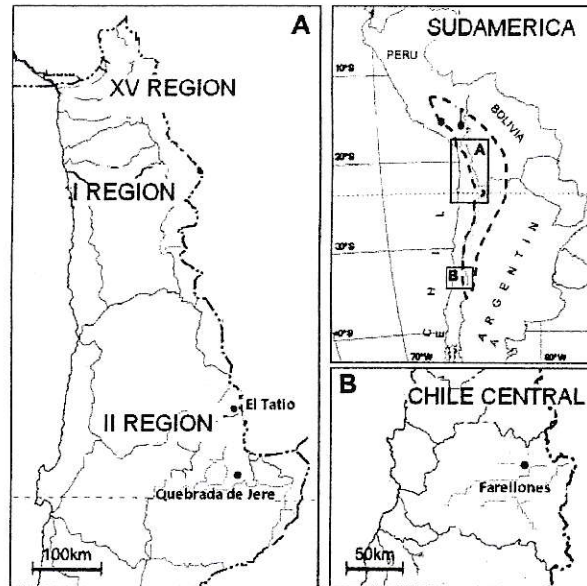


Figura 1: Mapa de las tres localidades de estudio de *Bufo spinulosus*: El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones.

<i>Localidad</i>	<i>Coordenadas geográficas</i>	<i>Altitud (msnm)</i>	<i>Ambiente larval</i>	<i>Dsecación de pozas</i>	<i>Temperatura promedio</i>	<i>Rango (°C)</i>	<i>Nieve en invierno</i>
El Tatio	22°20'23''S; 68°01'06''W	4.350	Aguas termales permanentes	No	25,3°C	24 - 26	No
Quebrada de Jere	23°11'21''S; 67°59'34''W	2.560	Pozas permanentes	No	13,4°C	10 - 17	No
Farellones	33°20'48''S; 70°18' 51''W	2.331	Pozas temporales	Si	21,7°C	5 - >30	Si

Tabla 1: Caracterización y comparación de las tres localidades involucradas, El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones, correspondientes a ambientes contrastantes a nivel de temperatura del agua y desecación de las pozas.

REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL

Se realizaron cruzamientos dirigidos de adultos de *Bufo spinulosus* recolectados en las localidades de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones, siguiendo un protocolo de inducción de ovulación de huevos (Benavides, 2003). Se crearon doce familias de medios-hermanos para las tres localidades de estudio: Farellones, El Tatio y Quebrada de Jere (Tabla 2). Este diseño de medios-hermanos permitió disminuir el efecto maternal en los rasgos evaluados.

	<i>Macho 1</i>	<i>Macho 2</i>	<i>Macho 3</i>	<i>Macho 4</i>
<i>Hembra 1</i>	x	x	x	
<i>Hembra 2</i>		x	x	x
<i>Hembra 3</i>	x		x	x
<i>Hembra 4</i>	x	x		x

Tabla 2: Esquema de los cruzamientos dirigidos en adultos de *Bufo spinulosus*, para la creación de familias de medios-hermanos.

EXPERIMENTOS DE JARDÍN COMÚN

Una vez en el estadio 25 de Gosner (Gosner, 1960) se ubicaron larvas individualmente en cajas plásticas de 300 ml. Se utilizaron 10 réplicas por familia y se pusieron a crecer a dos temperaturas: 20 y 25°C. Durante todo el desarrollo del experimento se mantuvo el volumen de agua y el fotoperiodo constantes (250 ml,

12H:12H). Las larvas fueron alimentadas con lechuga cocida *ad libitum* y se les cambió agua cada tres días y medios.

EXPERIMENTOS DE DESEMPEÑO LOCOMOTOR

Larvas: Cuando las larvas alcanzaron el estadio 38 de Gosner (Gosner, 1960) se ubicaron en un baño termorregulado, la mitad a 20°C y las restantes a 25°C, para cada tratamiento. Este baño posee un tubo de vidrio de 60 cm. de largo, y una cámara donde fue instalada cada larva. Se dio un estímulo eléctrico de 9 V (Wilson y Franklin, 1999) y se midió el tiempo de nado que demoran en recorrer el tubo, usando un cronómetro digital (Fig. 2). Se realizaron tres mediciones por larva, se les midió el largo antero-posterior y cada larva fue devuelta a su tratamiento original para esperar la metamorfosis.

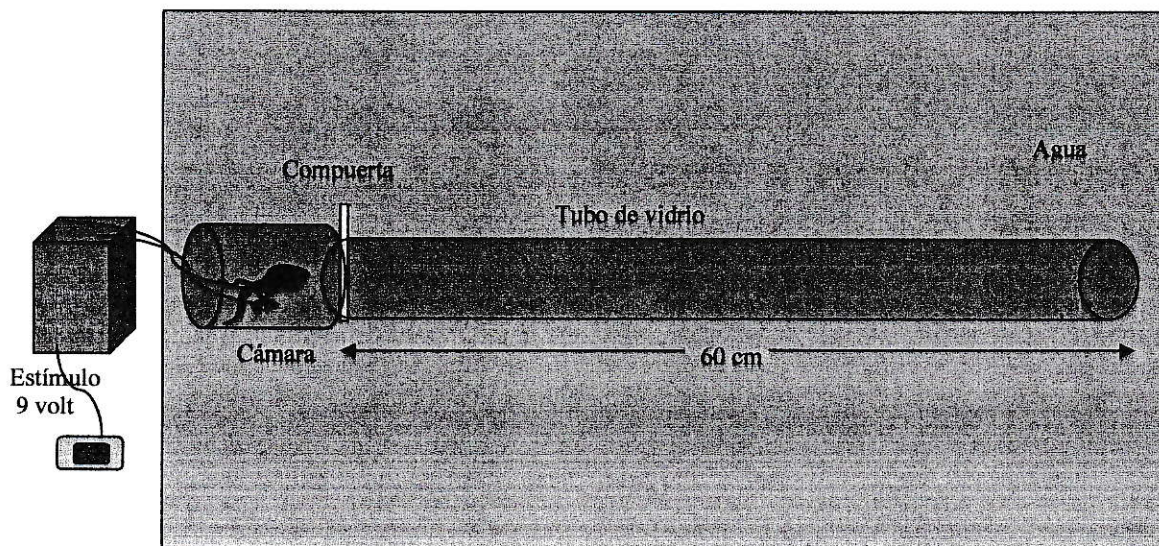


Figura 2: Metodología empleada para medir el desempeño locomotor de larvas, como tiempo de nado en segundos.

Postmetamórficos: Inmediatamente después de la metamorfosis (estadio 46; Gosner, 1960), las larvas fueron aclimatadas por tres días en una pieza a 20°C. Para las mediciones de salto, a cada postmetamórfico se le untaron sus extremidades en azul de metileno y se hicieron saltar sobre un papel blanco, usando un pincel como estímulo en el urostilo (Fig. 3). Se realizaron dos series de cuatro saltos consecutivos en trayectoria lineal. Para los análisis posteriores se utilizó la distancia máxima registrada. Una vez realizado este experimento, los animales fueron anestesiados con MS-222 (metanosulfonato de triclaína) y fijados en etanol 70% para las mediciones morfológicas.

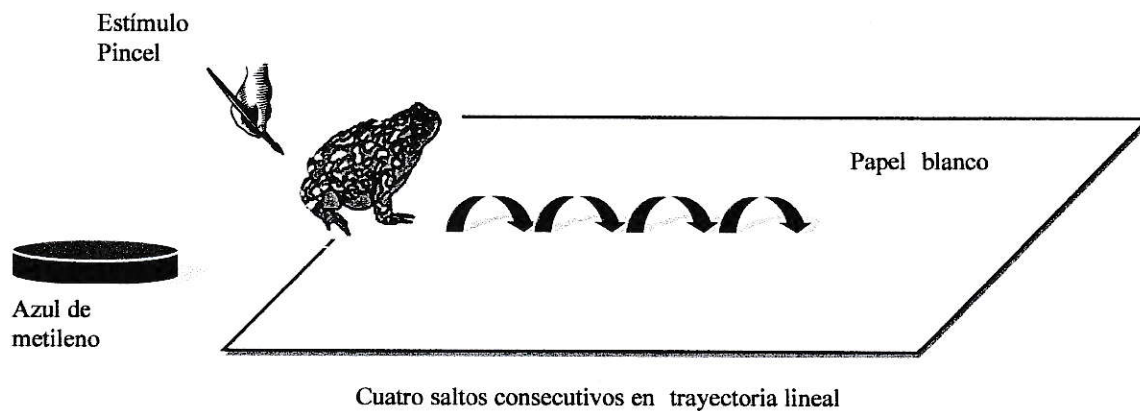
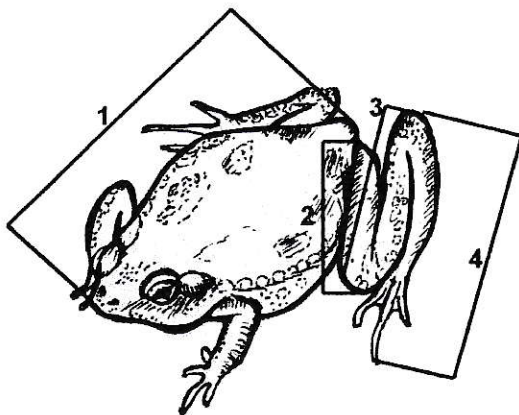


Figura 3: Metodología utilizada para la medición de desempeño locomotor de postmetamórficos, medida como distancia de salto máximo.

MEDICIONES MORFOLÓGICAS

A cada postmetamórfico se le midió el tamaño corporal como largo antero-posterior (SVL), y el largo de la tibio-fíbula. Adicionalmente, se les midió el largo del fémur, del tarso-metatarso, y la extremidad completa, que corresponde a la sumatoria de las tres subdivisiones (Fig. 4).



1. Largo antero-posterior (SVL snout-vent length).
2. Largo femur.
3. Largo tibio-fíbula.
4. Largo tarso-metatarso incluyendo falanges.

Figura 4: Mediciones morfológicas en postmetamórficos de *Bufo spinulosus*: tamaño corporal o SVL, largo del fémur, largo de la tibio-fíbula, y largo del tarso-metatarso incluyendo falanges, y largo de la extremidad posterior completa como la sumatoria de los tres segmentos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron convertidos a \log_{10} para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para determinar el efecto de la temperatura y la localidad sobre los atributos de historia de vida se realizaron tres Análisis de Varianza (ANOVA)

factoriales, con tamaño a la metamorfosis (SVL), edad a la metamorfosis y tasa de crecimiento como variables dependientes, en estos análisis la temperatura y la localidad fueron tratadas como efectos fijos. Para evaluar el efecto de la temperatura y la localidad en el desempeño de nado de larvas y saltos de postmetamórficos, se hizo un Análisis de Covarianza (ANCOVA), con el largo antero-posterior de la larva y el largo de la tibio-fíbula, como covariados respectivamente. Para evaluar el efecto de la temperatura y la procedencia geográfica sobre el largo de la tibio-fíbula de los postmetamórficos, se realizó un ANCOVA usando el tamaño corporal como covariado. A cada prueba se le realizó un test *a posteriori* de Bonferroni. Para determinar la existencia de correlación entre el desempeño locomotor de larvas y postmetamórficos, se realizó una correlación de Pearson. Para evaluar si los rasgos de historia de vida se asocian al desempeño de nado, se realizaron regresiones entre tiempo de nado de larvas y tasa de crecimiento, y tiempo de nado de larvas y tiempo a la metamorfosis. Para determinar si el largo de la tibio-fíbula se ajusta al tamaño corporal de los postmetamórficos se realizó una regresión simple. Se realizaron otras regresiones entre largo de la tibio-fíbula y distancia de salto máximo, tasa de crecimiento y distancia de salto máximo, y tasa de crecimiento y largo de la tibio-fíbula. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2001).

RESULTADOS

ATRIBUTOS DE HISTORIA DE VIDA

El tamaño corporal fue mayor para los postmetamórficos provenientes de Quebrada de Jere y El Tatio (Fig. 5). Esta diferencia fue determinada por efecto de la localidad (F: 30,947; $p < 0,001$; ANOVA factorial), mientras que la temperatura y la interacción entre ambas variables no fue significativa. La prueba *a posteriori* mostró que las larvas de Farellones fueron diferentes a las otras dos localidades ($p < 0,001$; Bonferroni).

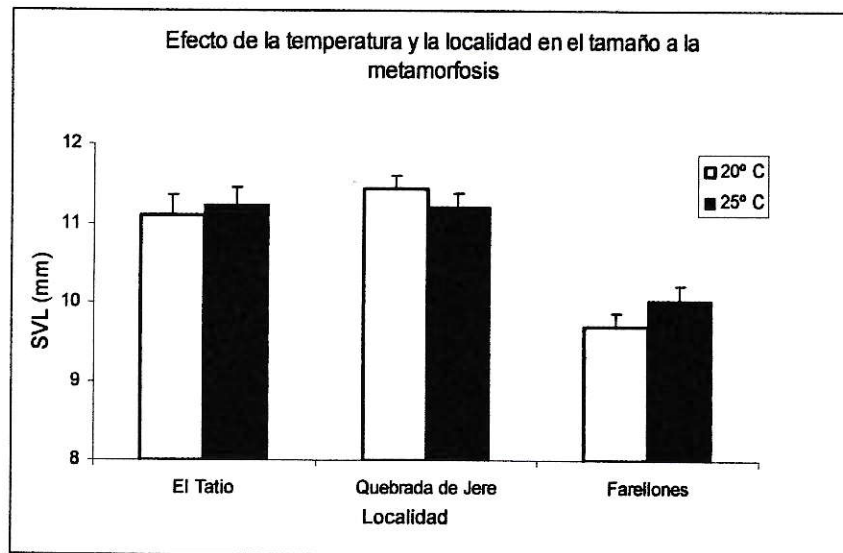


Figura 5: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el tamaño corporal (SVL) a la metamorfosis de individuos de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones, desarrollados a 20°C y 25°C.

En la Fig. 6 se observa que los individuos de Farellones presentaron el menor tiempo a la metamorfosis, en relación a las larvas del norte de Chile. Todas las larvas aceleraron la metamorfosis a 25°C. Los resultados del ANOVA mostraron que estas diferencias estuvieron dadas por la temperatura (F: 38,49; $p < 0,001$; ANOVA factorial), la localidad (F: 32,75; $p < 0,001$; ANOVA factorial) y la interacción temperatura-localidad (F: 3,090; $p < 0,001$; ANOVA factorial). La prueba *a posteriori* mostró que el tiempo a la metamorfosis de larvas de Farellones fue diferente a las del norte ($p < 0,001$; Bonferroni).

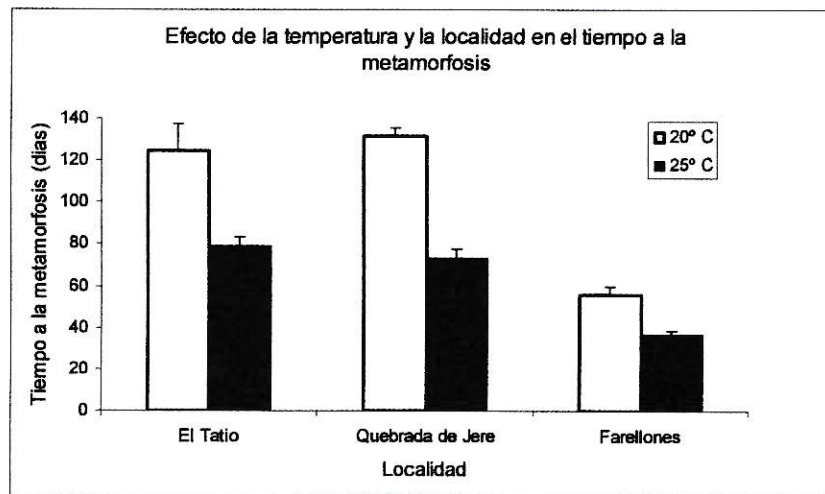


Figura 6: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el tiempo a la metamorfosis de individuos de *Bufo spinulosus* provenientes de los dos tratamientos de temperatura y de las tres localidades de estudio.

La tasa de crecimiento fue mayor para los individuos de la localidad de Farellones (Fig. 7), la cual siempre fue mayor a 25°C que a 20°C. Estas diferencias fueron atribuidas a la temperatura (F: 23,85; $p < 0,001$; ANOVA factorial), la localidad (F: 171,69; $p < 0,001$; ANOVA factorial) y la interacción temperatura-localidad (F:

4,693; $p=0,0006$; ANOVA factorial). Las larvas de Farellones tuvieron tasas de crecimiento mayores a larvas de El Tatio y Quebrada de Jere ($p<0,001$; Bonferroni).

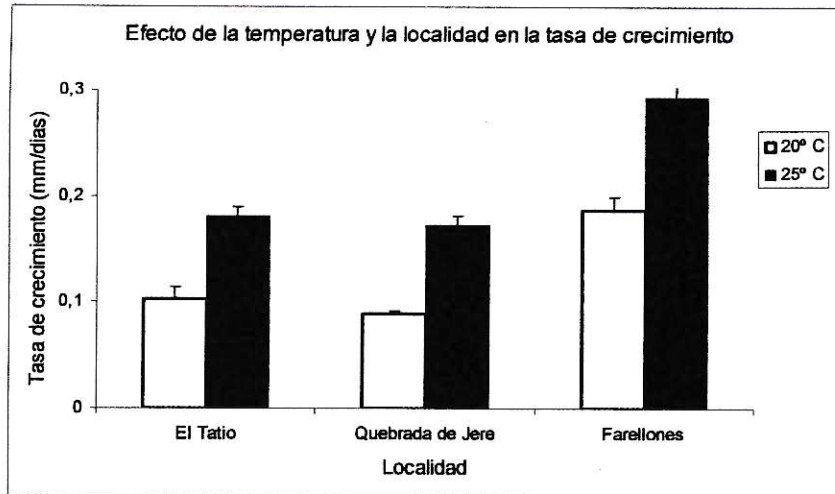


Figura 7: Efecto de la temperatura y la localidad sobre la tasa de crecimiento de postmetamórficos sometidos a dos temperaturas: 20°C y 25°C, provenientes de las tres localidades de estudio.

DESEMPEÑO LOCOMOTOR

No se observaron diferencias en el tiempo de nado de las larvas aclimatadas a 20°C y 25°C, para cada tratamiento ($p>0,05$; t-test), por lo tanto los datos fueron agrupados. Las larvas de Farellones, tanto a 20°C como a 25°C, presentaron el menor tiempo de nado, en comparación con las larvas de las otras localidades (Fig. 8). Las larvas de El Tatio y Quebrada de Jere mostraron un tiempo de nado menor a 20°C que a 25°C, independiente del largo anteroposterior (Fig. 9). Tanto la localidad (F: 138,42;

$p < 0,001$; ANCOVA), como la interacción temperatura-localidad ($F: 5,900$; $p = 0,003$; ANCOVA) afectaron el tiempo de nado, donde las diferencias estuvieron dadas por larvas de Farellones ($p < 0,001$; Bonferroni). Los análisis de correlación no resultaron significativos para el desempeño de nado y atributos de historia de vida ($p > 0,05$; Pearson).

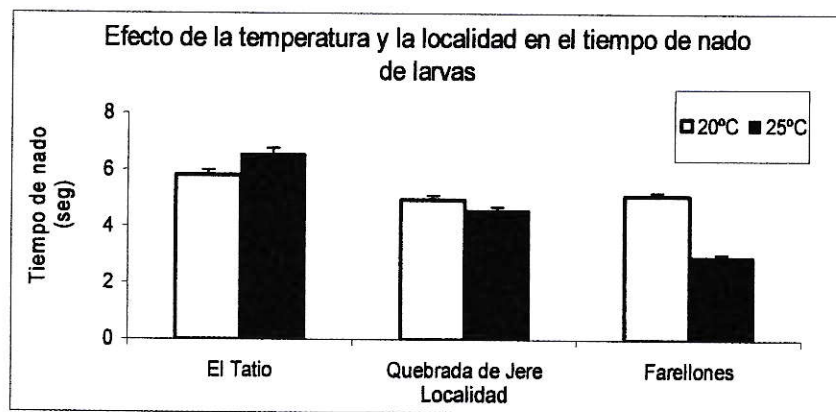


Figura 8: Efecto de la temperatura y la localidad en el tiempo de nado (segundos) de larvas de *Bufo spinulosus* sometidos a dos temperaturas: 20°C y 25°C, provenientes de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones.

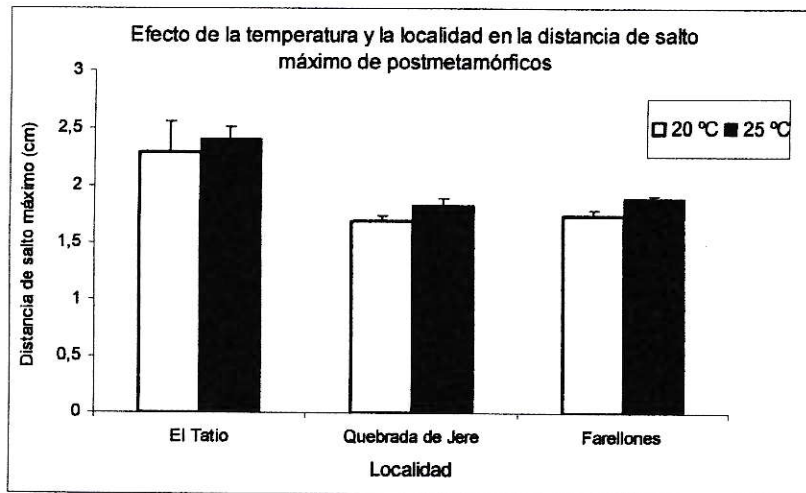


Figura 10: Efecto de la temperatura y la localidad en la distancia de salto máximo de postmetamórficos de *Bufo spinulosus* provenientes de las tres localidades de estudio, sometidas a dos temperaturas. Se muestra la distancia de salto máximo promedio para cada tratamiento, con barras de error.

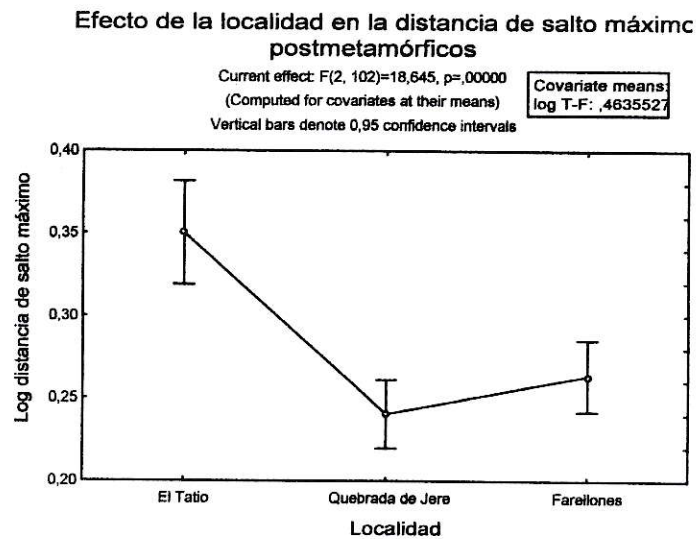


Figura 11: Efecto de la localidad sobre la distancia de salto máximo, medido en centímetros, de postmetamórficos de El Tatio, Quebrada de Jere y Farellones. Se corrigió por el largo de la tibio-fíbula.

MORFOLOGÍA

En la Fig. 12 se observa que los individuos de El Tatio presentaron una tibio-fíbula larga, a las dos temperaturas, y los postmetamórficos de Farellones mostraron una tibio-fíbula corta. Los individuos de Quebrada de Jere, a 20°C presentaron un largo de tibio-fíbula similar a los de El Tatio, sin embargo, a 25°C, fue muy parecida a los postmetamórficos de Farellones (Tabla 3). Este patrón se repite al graficar el largo de la tibio-fíbula corregido por tamaño corporal (Fig. 13). Tanto la localidad como la interacción fueron significativos (F:52,74; $p < 0,001$ y F:21,79; $p < 0,001$; ANCOVA). La prueba *a posteriori* mostró que a 20°C las diferencias en el largo de la tibio-fíbula estuvieron dadas por los postmetamórficos de Farellones, y a 25°C por los de El Tatio ($p < 0,001$; Bonferroni). Al utilizar los datos del largo de fémur, tarso-metatarso o extremidad posterior completa, los resultados fueron similares a los de tibio-fíbula (Tabla 3). La regresión entre tamaño corporal y largo de la tibio-fíbula no resultó significativa ($p > 0,05$; Regresión). La regresión entre largo de la tibio-fíbula y la distancia de salto máximo tampoco resultó significativa ($p > 0,05$; Regresión). Al evaluar otros modelos no lineales no se encontró una relación significativa entre el largo de la tibio-fíbula y la distancia de salto máximo, mostrando niveles de correlación bajos, siendo el más alto un ajuste lineal con un R^2 de 0.21 para la localidad de Quebrada de Jere a 20°C, y los otros valores fluctuaron en niveles cercanos a $R^2 = 0.001$. Por lo anterior, se concluye que no existió una relación entre largo de la tibio-fíbula y la distancia de salto máximo, y que esta ausencia es independiente del modelo o ajuste estadístico utilizado.

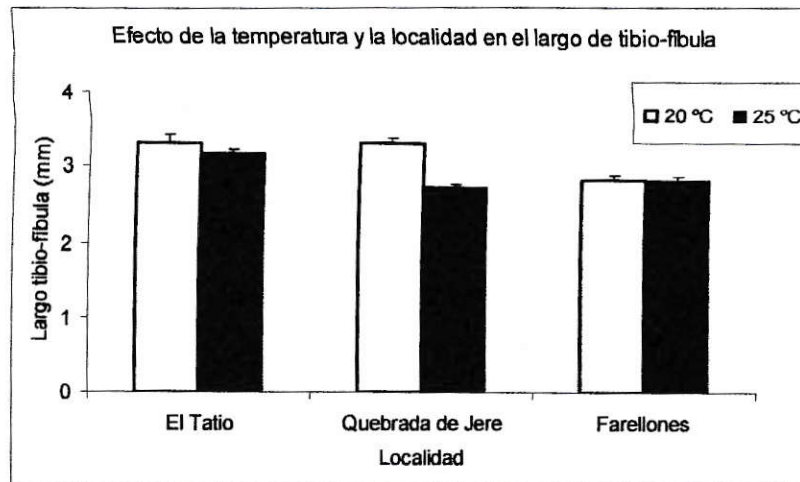


Figura 12: Efecto de la temperatura y la localidad en el largo de la tibio-fibula (mm), corregido por tamaño corporal para postmetamórficos de *Bufo spinulosus* provenientes de las tres localidades de estudio y de los dos tratamientos de temperatura.

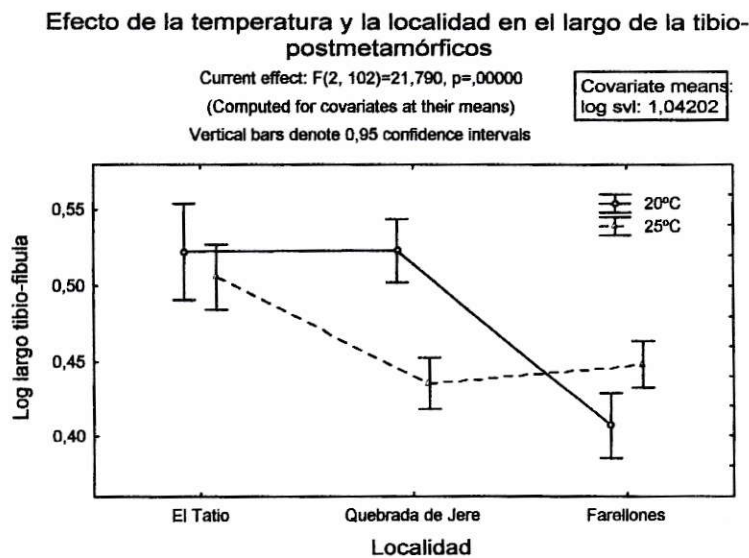


Figura 13: Efecto de la temperatura y la localidad sobre el largo de la tibio-fibula de los postmetamórficos provenientes de las tres localidades de estudio. Se corrigió por tamaño corporal.

DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó un diseño de medios hermanos, para disminuir los efectos maternos sobre los rasgos evaluados. Se ha descrito que el fenotipo de la madre puede influenciar el fenotipo de las crías (Mousseau y Fox, 1998), donde el genotipo materno y el ambiente materno (como el tipo de pozas elegidas por las hembras), podrían llegar a explicar la varianza total de un rasgo, como es el caso del peso corporal de postmetamórficos de *Bombina orientalis* (Kaplan, 1987). Dado que en este estudio, se removieron los efectos maternos, ya que los huevos de cada hembra fueron fecundados con tres machos diferentes, generando familias de medios hermanos, se puede plantear que la existencia de diferencias en los atributos de historia de vida encontrada en esta tesis, se debe a los factores evaluados, es decir la temperatura y la procedencia geográfica, o la interacción de estos factores dependiendo del rasgo. Las larvas de la localidad de Farellones presentaron un menor tamaño a la metamorfosis (SVL) y menor tiempo de desarrollo, mientras que las larvas de El Tatio y Quebrada de Jere tuvieron un mayor tiempo de desarrollo y metamorfosearon a mayor tamaño. Estos resultados están de acuerdo a la literatura, donde se ha demostrado que para ectotermos existe un efecto de la temperatura sobre el desarrollo larval, aumentando la tasa de crecimiento (Atkinson, 1996), y una aceleración de la metamorfosis produce tamaños corporales menores, como costo asociado al desarrollo acelerado (Newman, 1992; Laurila y Kujasalo, 1999; Laurila *et al*, 2002; Merilä *et al*, 2004).

Dado que para este estudio se realizaron experimentos de jardín común, los cuales permiten distinguir entre diferenciación genética e inducción ambiental (Conover y Shultz, 1995), fue posible llegar a los siguientes resultados: para las tres poblaciones evaluadas el tamaño a la metamorfosis fue sólo dependiente de la localidad, mientras que la temperatura no afectó esta variable. En contraste, tanto el tiempo a la metamorfosis como la tasa de crecimiento, fueron afectados por la interacción entre la temperatura de desarrollo y la procedencia geográfica, sugiriendo la existencia de variación fenotípica asociada a estos factores (Atkinson, 1996; Laurila y Kujasalo, 1999; Laurila *et al*, 2002; Mõrila *et al*, 2004; Sinsch *et al*, 2007). Los menores tiempos a la metamorfosis, así como las mayores tasas de crecimiento presentadas por los individuos de Farellones, a las dos temperaturas evaluadas, darían cuenta de la adaptación local por parte de esta especie al régimen natural de desecación de pozas de esa localidad, este patrón ha sido reportado para las poblaciones de *Rana temporaria* de Suecia, por Laurila y Kujasalo (1999) que presenta una distribución geográfica amplia, habitando en ambientes contrastantes. En Farellones las pozas empiezan a evaporarse a mediados de Noviembre (Tabla 1), disminuyendo el volumen de agua, con el consiguiente aumento de la temperatura de la poza, llegando a mediodía a una temperatura por sobre los 30° C (Benavides, 2003). Esto implica que el régimen de desecación de pozas conlleva, además de la desecación *per se*, un aumento de la temperatura del agua, lo que habría influido en la rápida tasa de crecimiento larval detectada para esta localidad. Para el caso de las larvas de la localidad de El Tatio, su ambiente corresponde a un caso distinto al que enfrentan las otras poblaciones alto andinas de esta especie en Chile. Esta localidad presenta un restringido régimen de variación diaria y anual de la temperatura de las pozas,

asimilable a un sistema tropical, pero de altura (Benavides, 2003; Tabla 1). Al respecto, se ha descrito que en ectotermos un mayor tamaño a la metamorfosis no estaría necesariamente asociado a una tasa de crecimiento mayor, sino que podría deberse a un desarrollo más lento, dado por la existencia de un desacople entre desarrollo y crecimiento (Atkinson, 1996). De este modo, es posible plantear que la población de *Bufo spinulosus* de El Tatio, dado que su ambiente es térmicamente constante tanto diario como anualmente (Tabla 1), no tendría una restricción temporal para alcanzar la metamorfosis, y por lo tanto se desarrollaría más lento, presentando una tasa de crecimiento lenta. Estos antecedentes llevan a postular que la población de El Tatio presentaría aclimatización termal (Schmidt-Nielsen, 1997), proceso a través del cual algunos animales ectotermos muestran ajustes compensatorios en respuesta a la temperatura (Hazel y Prosser, 1970). Esto muestra adaptación local de las larvas de El Tatio a su régimen de temperatura. A partir de estos resultados se puede postular que la variación geográfica sobre el fenotipo se entendería en términos de restricciones de tipo estacionales, las cuales son diferentes dependiendo de la localidad, como sugiere Laurila, *et al* (2004).

Los resultados de este estudio muestran que existe un efecto conjunto de la temperatura y la localidad sobre la velocidad de nado de las larvas (Figura 6), sin embargo, si se excluyen los resultados de las larvas de Farellones, solo la temperatura explica las diferencias de la velocidad de nado entre larvas de El Tatio y Quebrada de Jere. Lo anterior, sugiere que la localidad de Farellones es la que determina el efecto de la procedencia geográfica. Doherty, *et al* (1998) y Lardner (2000) sugieren que larvas desarrolladas a mayores temperaturas, al tener un tamaño corporal menor, disminuyen su velocidad de nado, este esperado no se observó para

las larvas de Farellones, las que nadaron más rápido cuando se desarrollaron a 25°C que a 20°C. Al comparar los tiempos de nado de las tres localidades evaluadas, se observó que las larvas de Farellones presentaron un mejor desempeño locomotor, tanto a 20°C como a 25°C.

Se ha documentado que el ambiente larval afecta atributos de historia de vida, y a su vez los rasgos de historia de vida podrían afectar el desempeño locomotor de anuros (Parichy y Kaplan, 1995; Ultsch *et al*, 1999; Wilson y Franklin, 1999; Wilson *et al*, 2000), de esta forma, la plasticidad inducida por la temperatura durante el desarrollo y el crecimiento también puede producir cambios en el desempeño de nado. En este trabajo se evaluó si la variación de los rasgos de historia de vida afectó el desempeño locomotor de larvas de *Bufo spinulosus*, sin embargo, los análisis de correlación entre el tiempo de nado de las larvas y la tasa de crecimiento no resultaron significativos, lo mismo ocurrió cuando se hizo el análisis con el tiempo a la metamorfosis. Esto sugiere que el desempeño locomotor no se asocia a estos atributos de historia de vida en larvas de *Bufo spinulosus*. Según los resultados de Benavides (2003) las larvas de Farellones presentaron bajas tasas metabólicas respecto a las de El Tatio, por lo tanto, a partir de este dato, tampoco es posible explicar la mayor velocidad de nado presentada por las larvas provenientes de esta localidad, en comparación a las de El Tatio y Quebrada de Jere. Si bien, existió un efecto conjunto de la temperatura y la localidad que explica la velocidad de nado en las tres poblaciones, dado que la velocidad de nado fue mayor a ambas temperaturas para las larvas de Farellones, es posible postular que la velocidad de nado de las larvas en esta localidad sería un rasgo poco variable en esta población. Navas (1997) estudiando poblaciones de anuros andinos, encontró un desempeño locomotor similar

para poblaciones que presentaban distintos T_b en sus ambientes, sugiriendo que el desempeño locomotor es muy conservado, resultado que es concordante con nuestras observaciones en *Bufo spinulosus*. La capacidad de salto es probablemente la mejor medición de desempeño en anuros postmetamórficos, debido a la relevancia de su potencial ecológico, tanto para actividades de forrajeo, como para escape frente a depredadores (Arnold y Wassersug, 1978). En este caso, los postmetamórficos de El Tatio presentaron mayores distancias de salto, en relación a los de Quebrada de Jere y Farellones, quienes saltaron distancias más cortas. Al excluir los datos de El Tatio, desapareció el efecto de la localidad, sugiriendo que en estadios postmetamórficos, son los animales de El Tatio los que introducen el efecto procedencia geográfica. Se ha discutido que el tamaño corporal afecta la capacidad locomotora y la distancia de dispersión de los postmetamórficos (Stevens *et al*, 2004), junto a otros factores como la temperatura corporal, el estado de hidratación y el largo de la extremidad posterior, específicamente de la tibio-fíbula (Zug, 1972; Preest y Pough, 1989; Sinsch, 1994; Ficetola y De Bernardi, 2006). En los postmetamórficos de este estudio, el largo de la tibio-fíbula tamaño-independiente fue afectado tanto por la temperatura, como por la procedencia geográfica. El largo de la tibio-fíbula, fue mayor para los postmetamórficos de El Tatio, y menor para los de Farellones. Los postmetamórficos de Quebrada de Jere presentaron un largo de tibio-fíbula variable según la temperatura. Los que crecieron a 20°C, presentaron una tibio-fíbula larga similar a los postmetamórficos de El Tatio, sin embargo, los que crecieron a 25°C, fueron similares a los postmetamórficos de Farellones. Estas diferencias podría atribuirse al modo de vida después de la metamorfosis, ya que los estadios postmetamórficos de Quebrada de Jere y de Farellones ocurren en ambientes

terrestres, en cambio los de El Tatio están restringidos a un ambiente acuático, en todas sus fases, no requiriendo migrar en los estadios tempranos hacia la tierra. El tamaño de la tibio-fíbula no se ajustó al tamaño corporal de los postmetamórficos, como ocurrió con *Rana cascade* (Blouin y Brown, 2000), ni con la capacidad de salto. Tampoco se encontró relación significativa entre tasa de crecimiento y distancia de salto, y, tasa de crecimiento y largo de la tibio-fíbula, sugiriendo que para *Bufo spinulosus*, la capacidad de salto no es dependiente del tamaño corporal, del tamaño de las extremidades posteriores, ni de la tasa de crecimiento. Este resultado está en desacuerdo con lo propuesto por Tejedo, *et al* (2000) quién encontró que larvas de *Rana ridibunda*, *Rana esculenta* y *Rana lessonae*, crecidas a temperaturas altas presentaron menor tamaño corporal y un desempeño de salto menor. Según Benavides (2003), quien midió las tasas metabólicas de larvas y el peso corporal de los postmetamórficos de *Bufo spinulosus* de cuatro localidades, encontró que las larvas de El Tatio presentaron tasas metabólicas altas, en relación a las larvas de Farellones y de otras localidades similares en altitud y latitud a Quebrada de Jere. Por otra parte, Benavides (2003) encontró que el peso corporal de los postmetamórficos de El Tatio era también superior a los postmetamórficos de las otras localidades, casi duplicándolos. Dado lo anterior, es posible argumentar la existencia de una mayor masa muscular para los postmetamórficos de esta localidad en comparación a los de Farellones, lo cual podría explicar la mayor distancia de salto de estos postmetamórficos.

La ausencia de correlación entre la velocidad de nado de las larvas y el desempeño de salto, en las tres localidades, sugiere la existencia de un desacople entre estos dos rasgos fisiológicos. De esta forma, las larvas que nadaron más rápido son las

provenientes de Farellones, y los postmetamórficos de El Tatio son los que presentaron mayor distancia de salto. Este resultado es concordante con Watkins (2001), quien no encontró correlación entre el desempeño locomotor de larvas y postmetamórficos de *Hyla regilla*. Esta diferencia, puede deberse en parte, a que los procesos fisiológicos involucrados en el nado y en el salto son diferentes (Rome *et al*, 1992; Navas, 1996), y por lo tanto, la dependencia termal del desempeño de nado y de salto no es necesariamente la misma (Navas *et al*, 2008). Una diferencia es que el salto es una sola contracción muscular, mientras que el nado involucra la cola y movimientos cíclicos de las extremidades posteriores (Navas, 1996). Por lo tanto, es esperable que estos desempeños no estén correlacionados, ya que las estructuras involucradas en el nado y en el salto son diferentes.

Como conclusión, este estudio sugiere que, a excepción del SVL y la distancia de salto, tanto el origen geográfico como el ambiente térmico larval producen cambios en los rasgos observados. De este modo, la interacción temperatura-localidad jugaría un rol importante en el tiempo a la metamorfosis, la tasa de crecimiento, el desempeño de nado y el tamaño de la extremidad posterior de los postmetamórficos. Este estudio aporta una aproximación que ha incorporado a la comparación de atributos, como crecimiento, tamaño a la metamorfosis y desempeño locomotor, la variable procedencia geográfica, permitiendo un análisis más integral de las variaciones observadas en estos rasgos en las poblaciones naturales. Esto ha permitido proponer que los fenotipos estudiados en su expresión dependen de distintos factores hilados en una trama compleja de efectos, determinados tanto por procesos locales como por el potencial de plasticidad de cada rasgo evaluado. Futuros estudios que se orienten a entender la relación entre rasgos de historias de

vida y el desempeño locomotor en otras especies de ectotermos, permitirán un entendimiento más cabal de estas interacciones y podrán determinar si la variación genética podría ser una explicación posible para la conservación de la fisiología termal en ectotermos (Angilletta *et al*, 2002).

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, D. y Nicieza, A.G. 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Funct. Ecol.* 16: 640-648.

Angilletta, M.J.; Niewiarowski, P.H. y Navas, C.A. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Ther. Biol.* 27:249–268.

Arnold, S.J. y Wassessug, R.J. 1978. Differential predation on metamorphic anurans by garter snakes (*Thamnophis*): social behavior as a possible defense. *Ecology* 59:1014–1022.

Atkinson, D. 1996. Ectotherm life-history responses to developmental temperature. En: Johnston I.A. y A.F. Bennett (Eds), *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation*. pp 183-204. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Benavides, A.G. 2003. Biología térmica de *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae): una comparación interespecífica. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Vii + 93 pp.

Berven, K.A. 1990. Factors affecting population fluctuation in larval and adult stages of the woodfrog (*Rana sylvatica*). *Ecology*. 71: 599-608.

Blouin, M.S. y Brown, S.T. 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*. 125: 358-361.

Bonnett, R.M. y Chippindale, P.T. 2004. Speciation, phylogeography and evolution of life history and morphology in plethodontid salamanders of the *Eurycea multiplicata* complex. *Mol. Ecol.* 13(5):1189–1203.

Camp, C.; Marshall, J.L. y Austin, R.M. 2000. The evolution of adult body size in black-bellied salamanders (*Desmognathus quadramaculatus* complex). *Can. J. Zoo.* 78: 712-722.

Conover, D.O. y Shultz, E.T. 1995. Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Trends Ecol. Evol.* 10: 248-252.

Dieckmann, U.; Doebeli, M.; Metz, J.A. y Tautz, D. 2004. Adaptive dynamics of speciation: sexual populations. (Eds), *Adaptive speciation*. pp 76–111. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.

Doherty, P.A.; Wassersug, R.J. y Lee, J.M. 1998. Mechanical properties of the tadpole tail fin. *J. Exp. Biol* 201: 2691-2699.

Duellman, W.E. y Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press Ltd, Baltimore.

Emerson, S.B. 1978. Allometry and jumping frogs: helping the twain to meet. *Evolution* 32:551–564.

Emerson, S.B. 1991. The ecomorphology of Bornean tree frogs (family Rhacophoridae). *Zool. J. Linn. Soc.* 101:337–357.

Falconer, D.S. y Mackay, T.M. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. 3rd Ed. Longman Sci. And Tech. Harlow, UK.

Ficetola, G.F. y De Bernardi, F. 2006. Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latestei*. *Evol. Ecol.* 20:143-158.

Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.

Hazel, J. y Prosser, C.L. 1970. Interpretation of Inverse Acclimation to Temperature. *Z. vergl. Phys.* 67:217-228.

John-Alder, H.B. y Morin, P.J. 1990. Effects of larval density on jumping ability and stamina in newly metamorphosed *Bufo woodhousei*. *Copeia* 1990:856–860.

Kaplan, R.H. 1987. Developmental plasticity and maternal effects of reproductive characteristics in the frog, *Bombina orientalis*. *Oecologia*. 71:273-279.

Laurila, A.; Pakkasmaa, S.; Crochet, P.A. y Merilä, J. 2002. Predator-induced plasticity in early life history and morphology in two anuran amphibians. *Oecologia*. 132: 524-530.

Laurila, A. y Kujasalo, J. 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J. Anim. Ecol.* 68:1123-1132.

Linhart, Y.B. y Grant, M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27:237-277.

Lutz, G.J. y Rome, L.C. 1994. Built for jumping: the design of the frog muscular system. *Science*. 263:370-372.

Méndez, M.; Soto, E.R.; Correa, C.; Veloso, A.; Vergara, E.; Sallaberry, M. y Iturra, P. 2004. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Rev. Ch. Hist. Nat.* 77: 559-567.

Merila, J.; Laurila, A. y Lindgren, B. 2004. Variation in the degree and costs of adaptive phenotypic plasticity among *Rana temporaria* populations. *J. Evol. Biol.* 17: 1132-1140.

- Miller, K.; Monteforte, P.B. y Landis, L.F. 1993. Scaling of locomotor performance and enzyme activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. *Herpetologica* 49:383–392.
- Mosseau, T.A. y Fox, C.W. 1998. The adaptative significance of maternal effects. *Tree*. 13:403-407.
- Navas, C.A. 1996. Metabolic physiology, locomotion performance and thermal niche breadth in neotropical anurans. *Phys. Zool.* 69: 1481-1501.
- Navas, C.A. 1997. Thermal extremes at high elevations in the Andes: Physiological ecology of frogs. *J. Ther. Biol.* 22:467-477.
- Navas, C.A.; Gomes, F.R. y Carvalho, J.E. 2008. Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: Integration and evolutionary implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 151: 344-362.
- Newman, R.A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* 42: 671–678.
- Núñez, H.; Labra, M.A. y Yáñez, J. 1982. Hábitos alimentarios de dos poblaciones andinas de *Bufo spinulosus* Wiegmann, 1835 (Anura: Bufonidae). *Bol. MNHN.* 39: 81-91.

Orr, M.R. y Smith, T.B. 1998. Ecology and Speciation. Trends Ecol. Evol. 13:502-508.

Parichy, D.M. y Kaplan, R.H. 1995. Maternal Investment and Developmental Plasticity: Functional Consequences for Locomotor Performance of Hatchling Frog Larvae. Funct. Ecol. 9: 606-617.

Pigliucci, M.; Cammell, K y Schmitt, J. 1999. Evolution of phenotypic plasticity: a comparative approach in the phylogenetic neighborhood of *Arabidopsis thaliana*. J. Evol. Biol. 12:779-791.

Preest, M.R. y Pough F.H. 1989. Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. Funct. Ecol. 3: 693-699.

Rome, L.C. Stevens, E y John-Alder, H.B. 1992. The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. En: Feeder ME & WW Burggren (eds) Environmental physiology of the amphibians: 183-249. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.

Ruiz, G.; Rosenmann, M. y Veloso, A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. Comp Biochem Physiol 94A: 643-646.

Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. Trends Ecol. Evol. 16:372-379.

Sinsch, U. y Eblemkamp, B. 1994. Allozyme variation among *Rana balcanica*, *R. levantina*, y *R. ridibunda*. *Zits. Zool. Syst. Evol.* 32 (1), 35-43.

Sinsch, U.; Leskovar, C.; Drobig, A.; König, A. y Grosse, W.R. 2007. Life history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators habitat quality. *Can. J. Zool.* 85:665-673.

Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology*. Cambridge University Press. *Animal physiology: adaptation and environment*. Fifth edition. Cambridge University Press, New York, New York, USA. ix + 607 pp.

StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0 www.statsoft.com.

Stevens, V.M.; Polus, E.; Wesselingh, R.A. Schtickzelle, N. y Baguette, M. 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Lands. Ecol.* 19: 829-842.

Tejedo, M.; Semlitsch, R.D. y Hotz, H. 2000. Covariation of Morphology and Jumping Performance in newly Metamorphosed Water Frogs: Effects of Larval Growth History. *Copeia.* 2: 448-458.

Ultsch, G.R.; Bradford, D.F. y Freda, J. 1999. Physiology: coping with the environment. En Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. Mc-Diarmid, R.W. y Altig, R. (eds). pp 189–214. University of Chicago Press, Chicago.

Veloso, A.; Sallaberry, M.; Navarro, J.; Iturra, P.; Valencia, J.; Penna, M. y Díaz, N. 1982. Contribución al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. En: Veloso, A. & E Bustos-Obregón (eds) El ambiente natural y las poblaciones humanas de los Andes del norte grande de Chile (Arica, Lat. 18° 28' S). pp 135-268. ROSTLAC, UNESCO, Montevideo, Uruguay.

Volker, H.; Rudolf, W. y Rodel, M.O. 2007. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. *Evol. Ecol.* 21: 121-142.

Watkins, T.B. 2001. A quantitative genetics test of adaptative decoupling across metamorphosis for locomotor and life-history traits in the pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Evolution.* 55:1668–1677.

Watkins, T.B.; Awantang, G. y Eagar, T.C. 2004. Effects of pre- and post-hatching temperature on locomotor performance and thermal preference of tadpoles. *Integr. Comp. Biol.* 44:760–760.

Watkins, T.B. y Vraspir, J. 2005. Both Incubation Temperature and Posthatching Temperature Affect Swimming Performance and Morphology of Wood Frog Tadpoles (*Rana sylvatica*). *Physiol Biochem Zool.* 79(1): 140-149.

Wilson, R.S. y Franklin C.E. 1999. Thermal acclimation of locomotor performance in tadpoles of the frog *Limnodynastes peronii*. *J. Comp. Physiol. B.* 169:445-451.

Wilson, R.S.; James, R.S y Johnston, I.A. 2000. Thermal acclimation of locomotor performance in tadpoles and adults of the aquatic frog *Xenopus laevis*. *J. Comp. Physiol. B.* 170:117-124.

Wolf, J.B.; Brodie, E.D.; Cheverud, J.M.; Moore, A.J. y Wade, M.J. 1998. Evolutionary consequences of indirect genetic effects. *Tree.* 13: 64-69.

Zug, G.R. 1972. Anuran locomotion: structure and function. Preliminary observations on relation between jumping and osteometrics of appendicular and postaxial skeleton. *Copeia* 1972, 613-624.