

UCH-FC
MAD-EBE
F443
C.1

“Efecto de la desecación y la densidad larval sobre rasgos de historia de vida, morfología y desempeño locomotor en *Rhinella spinulosa* (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

Pablo Fibla López

Junio, 2012

Director de Tesis: Dr. Marco A. Méndez T.

Co-Director de tesis: Dr. Michel Sallaberry A.





FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

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

PABLO FIBLA LÓPEZ

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 26 de diciembre del 2011.

Director de tesis:

Dr. Marco A. Méndez T.

Co-director de Tesis:

Dr. Michel Sallaberry A.

Comisión evaluadora de la tesis:

Dr. Claudio Veloso.....

Dr. Pablo Sabat





A mi hija, Gabriela



Nací el ocho de abril de 1987, en Antofagasta. Cursé la educación básica y media en el Colegio San José de esa ciudad, en donde recibí mis primeros conocimientos en ciencias naturales los que me motivarían posteriormente a continuar estudiando biología. El año 2005 ingrese a estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Biología en la Universidad de Chile. Obtuve el grado de Licenciado en Ciencias el año 2009. Mi interés ahora está centrado en realizar estudios de adaptación local y variación morfológica en el anfibio *Rhinella spinulosa* dada su importancia en la biología evolutiva de esta especie.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, Marco Méndez por guiarme en la realización de esta tesis, por sus enseñanzas y su amistad, y a Michel Sallaberry por su amistad y apoyo. Quiero agradecer también a la comisión evaluadora, profesores Claudio Veloso y Pablo Sabat por sus valiosos comentarios y correcciones en la realización de esta tesis.

Criar renacuajos en grandes cantidades implica trabajar de manera constante y dedicada, por esto agradezco al equipo de la cámara fría: Moisés Valladares, Luis Pastenes, Hugo Salinas y Carlos Pino, quienes me ayudaron a efectuar los experimentos de esta tesis. Además, quiero agradecer a toda la gente del laboratorio de Genética y Evolución: Carolina Gallardo, Paola Sáez, Dayana Vásquez, Pamela Morales, Gonzalo Collado, Claudio Correa, Franco Cruz y Álvaro Zúñiga, por su amistad y por escucharme y corregirme en esas largas tardes de seminario.

Quiero agradecer también a todos mis amigos de infancia que están en Antofagasta y a los que he conocido en Santiago, sobre todo a los del Friedemann Brock Fútbol Club.

Finalmente agradezco a toda mi familia, especialmente a Stephanía y a mi hija Gabriela por darme alegría y amor incondicional, y a mi hermano, mi mamá y mi papá por ayudarme a crecer cada día más.

INDICE



Lista de tablas.....	v
Lista de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	10
Resultados.....	20
Discusión.....	32
Conclusión y Proyecciones.....	41
Referencias.....	42



LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Promedio, error estándar, número muestral y coeficiente de variación para la tasa de crecimiento, ancho del cuerpo (larva), velocidad de nado, largo de la tibia-fíbula y distancia de salto en cada tratamiento experimental.
- Tabla 2. Resultados de los análisis multivariado (MANCOVA) y univariado (ANCOVA) de covarianza para los caracteres morfológicos de las larvas.
- Tabla 3. Resultados de los análisis multivariado (MANCOVA) y univariado (ANCOVA) de covarianza para los caracteres morfológicos de los post-metamórficos.
- Tabla 4. Resultados de los análisis de correlación para las variables evaluadas.
- Tabla 5. Resumen de las principales preguntas y resultados obtenidos en esta tesis.



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de los tratamientos realizados en el experimento de jardín común.
- Figura 2. Esquema de la medición del desempeño locomotor en las larvas y los post-metamórficos.
- Figura 3. Mediciones morfológicas realizadas a las larvas estadio Gosner 38.
- Figura 4. Mediciones morfológicas realizadas a los post-metamórficos.
- Figura 5. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre el porcentaje de sobrevivida y el tamaño a la metamorfosis (SVL) de los individuos.
- Figura 6. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre el tiempo a la metamorfosis y la tasa de crecimiento de las larvas.
- Figura 7. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre el ancho relativo de la cabeza y sobre el largo relativo de la tibia-fíbula de los post-metamórficos.
- Figura 8. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre la velocidad relativa de nado de las larvas y sobre la distancia de salto de los post-metamórficos.
- Figura 9. Correlación entre la tasa de crecimiento y la distancia de salto de los individuos en los diferentes tratamientos experimentales.

RESUMEN

Para los anfibios que se reproducen en pozas temporales, la desecación y la densidad larval de las pozas son factores que pueden inducir variación en rasgos de historia de vida durante el desarrollo larval, y afectar la morfología y desempeño locomotor del post-metamórfico. Se exploró la variación en rasgos de historia de vida, morfología y desempeño locomotor en larvas y post-metamórficos de *Rhinella spinulosa* en función de diferentes condiciones de desecación y densidad larval, utilizando un experimento de jardín común. Se recolectaron tres puestas de huevos desde la localidad de Farellones (33°20'S, 70°18'W). Se evaluó la respuesta de las larvas individuales que experimentaron desecación en dos estadios larvales (25 y 36 Gosner) en densidad larval baja y alta. Determinamos la sobrevivencia a la metamorfosis, la tasa de crecimiento, el tiempo y el tamaño a la metamorfosis de los individuos. Se midieron ocho rasgos morfológicos de las larvas y doce de los post-metamórficos. Adicionalmente, con el fin de evaluar una posible correlación entre rasgos del desempeño locomotor de la larva y del post-metamórfico utilizamos los mismos individuos para medir su velocidad de nado cuando eran larvas y su distancia de salto una vez que completaron la metamorfosis. Los resultados muestran que las larvas crecidas en el tratamiento de desecación en el estadio Gosner 25 en densidad larval alta experimentaron una disminución de la tasa de crecimiento, un aumento del tiempo a la metamorfosis y una disminución de la sobrevivencia a la metamorfosis con respecto a las larvas crecidas en ausencia de esas variables. No se encontraron diferencias en el largo corporal de los post-metamórficos entre los tratamientos. Detectamos que las larvas crecidas en densidad alta tuvieron un cuerpo y cola más anchos que las larvas crecidas en densidad baja. Los post-metamórficos crecidos en el tratamiento de desecación tuvieron una cabeza más pequeña y tibio-

fibulas más cortas que los crecidos sin desecación. Además, la densidad alta produjo una disminución en la velocidad de nado de las larvas, que fue independiente de su largo total, mientras que la desecación produjo una disminución en la distancia de salto absoluta de los post-metamórficos. Finalmente, la velocidad de nado de la larva no se correlacionó con la distancia de salto del post-metamórfico. Interesantemente, la tasa de crecimiento tuvo una correlación significativa y positiva con la distancia de salto del post-metamórfico, lo que sugiere que la historia de crecimiento experimentada durante la fase larval puede inducir variación morfológica en los individuos post-metamórficos y provocar diferencias en su desempeño locomotor.

ABSTRACT

For amphibians that breed in temporary ponds, desiccation and larval density of the ponds are factors that can induce variation in life history traits during larval development and affect morphology and locomotor performance of post-metamorphic. Variation in life history traits, morphology and locomotor performance in larvae and post-metamorphic of *Rhinella spinulosa* as a function of different desiccation and larval density conditions was explored using a common garden experiment. Three egg clutches were collected from Farellones locality (33°20'S, 70°18'W). The response of individual larvae that experienced desiccation in two different larval stages (Gosner 25 and 36) at high and low larval density was evaluated. We determined survival to metamorphosis, growth rate, time and size to metamorphosis of individuals. Eight larval and twelve post-metamorphic morphological traits were measured. Additionally, in order to evaluate a possible correlation between larval and post-metamorphic locomotor performance traits we used the same individuals to measure their swimming speed when they were larvae and their jumping distance once they completed metamorphosis. The results show that larvae grown in desiccation treatment at Gosner stage 25 in high larval density experienced a decrease in growth rate, an increase in time to metamorphosis and a decrease on survival to metamorphosis with respect to larvae grown in absence of those variables. No differences in post-metamorphic body length between treatments were found. We detected that larvae grown at high density had a wider body and tail than larvae grown at low density. Post-metamorphic grown in desiccation treatment had a smaller head and shorter tibia-fibulas than those grown without desiccation. Moreover, high density produced a decrease in larval swimming speed, which was independent of their total length, while desiccation produced a decrease in absolute jumping distance of post-

metamorphic. Finally, larval swimming speed was not correlated with post-metamorphic jumping distance. Interestingly, growth rate had a significant and positive correlation with post-metamorphic jumping distance which suggests that growth history experienced during larval phase can induce morphologic variation on post-metamorphic individuals and provoke differences in their locomotor performance.

INTRODUCCIÓN

El término ciclo de vida complejo se aplica a los organismos que presentan historias de vida que incluyen un cambio ontogenético abrupto en la morfología, fisiología y conducta de los individuos, usualmente asociado a un cambio de hábitat (Wilbur 1980). En estos organismos, el tamaño y la edad a las transiciones ontogenéticas de historia de vida, como en la metamorfosis o la maduración, pueden determinar la adecuación biológica de los individuos y por lo tanto desempeñan un papel fundamental en la evolución de las historias de vida (Roff 1992; Stearns 1992). Por lo tanto, los animales que poseen ciclos de vida complejos, como los anfibios, son de particular interés en el estudio de la evolución de los rasgos de historias de vida (Hensley 1993). Se conoce que en anfibios la duración del período larval y el tamaño a la metamorfosis son rasgos plásticos, siendo afectados por una serie de factores ambientales como la densidad larval, la permanencia del hábitat y la temperatura (Wilbur y Collins 1973; Collins 1979; Travis 1984; Alford y Harris 1988; Newman 1988, 1989, 1992; Tejedo y Reques 1994, 1997; Denver 1997). Las respuestas de las larvas de anfibios en la variación de rasgos de historia de vida han recibido una considerable atención en la literatura (Leips y Travis 1994), habiéndose desarrollado una cantidad importante de trabajos experimentales y modelos teóricos para entender la variación en la respuesta de las larvas frente a factores bióticos y abióticos (e.g. Wilbur y Collins 1973; Smith-Gill y Berven 1979; Travis 1984).

Wilbur y Collins (1973) propusieron que la duración del período larval, la tasa de desarrollo y el tamaño a la metamorfosis dependen de la historia de crecimiento larval. En su modelo postulan un tamaño corporal mínimo al cual el inicio de la metamorfosis es posible, y un tamaño corporal máximo al cual el inicio de la metamorfosis es obligatorio. Entre estos dos tamaños, la metamorfosis se inicia cuando ocurre una disminución en la tasa de crecimiento. De acuerdo a este modelo, diversos factores ambientales influyen sobre el tamaño y la edad a la metamorfosis induciendo cambios en la tasa de crecimiento de los individuos. Este modelo predice que si la tasa de crecimiento de una larva aumenta, la tasa de desarrollo disminuiría, extendiendo el período larval en ambientes favorables, lo que permitiría a las larvas alcanzar mayores tamaños a la metamorfosis. En contraste, si la tasa de crecimiento de una larva disminuye, la tasa de desarrollo aumentaría, lo que permitiría a las larvas acelerar el desarrollo larval en ambientes deteriorados, pero alcanzando tamaños menores a la metamorfosis. De acuerdo a las predicciones de este modelo, las larvas exhiben plasticidad fenotípica adaptativa en respuesta a las condiciones ambientales. Además, se asume que las larvas pueden responder a las condiciones ambientales virtualmente en cualquier punto en el desarrollo. Travis (1984), realizando experimentos con larvas de *Hyla gratiosa*, propone que la tasa de desarrollo se fija tempranamente en el período larval, pero el crecimiento continua siendo plástico resultando en variación en el tamaño a la metamorfosis. Existen por lo tanto limitaciones en la plasticidad, relacionadas a diferencias temporales en la sensibilidad del crecimiento y desarrollo a las condiciones ambientales (Smith-Gill y Berven 1979; Alford y Harris 1988; Hensley 1993). Esto sugiere que la respuesta de la tasa de crecimiento y desarrollo de las larvas puede variar

dependiendo del estadio larval (Gosner 1960) en el cual se producen cambios en el ambiente donde se desarrollan.

En general, se considera que en organismos con ciclos de vida complejos la metamorfosis produce la evolución independiente de diferentes estadios de historia de vida (e.g. larva, post-metamórfico), permitiendo que los estadios pre y post-metamórfico se adapten independientemente a su respectivo ambiente (Hipótesis de desacople adaptativo, Moran 1994). Sin embargo, hay evidencia que sugiere que existen rasgos en el adulto y la larva que pueden no ser completamente independientes evolutivamente en anfibios (Watkins 2001; Ficetola y De Bernardi 2006; Richter-Boix y col. 2006), y que los costos pueden persistir a lo largo de los estadios de historia de vida, a pesar de que ocurra metamorfosis (Ficetola y De Bernardi 2006). En particular, las variaciones en el desarrollo y crecimiento larval pueden tener consecuencias sobre rasgos del post-metamórfico, por ejemplo en su morfología y desempeño locomotor (Newman 1992; Richter-Boix y col. 2006; Tejedo y col. 2010).

Las pozas temporales son ejemplos clásicos de ambientes heterogéneos (Newman 1992). En estos ambientes inciertos, una tasa de desarrollo plástica se considera adaptativa debido a la heterogeneidad del ambiente larval (Wilbur y Collins 1973). Cuando el riesgo de mortalidad en el ambiente de las larvas aumenta en función del tiempo, se favorece una aceleración del desarrollo larval en desmedro de las consecuencias asociadas a un tamaño menor a la metamorfosis (Werner 1986; Brady y Griffiths 2000). Por otra parte, es sabido que un incremento en la densidad larval, que puede ocurrir en asociación a la desecación, provoca la prolongación del período larval y la reducción del tamaño a la metamorfosis (Wilbur y Collins 1973; Berven y Gill 1983). Asimismo, el

tamaño que alcanzan los individuos a la metamorfosis puede tener un efecto en la sobrevivencia del juvenil (Martof 1952), en la edad y el tamaño a la madurez (Smith 1987; Semslitch y col. 1988), y en su desempeño locomotor (Arnold y Wassersug 1978; Emerson 1978; John-Alder y Morin 1990; Beck y Congdon 2000), rasgos considerados adaptativos en anuros. Además del tamaño corporal, la morfología de los individuos puede determinar su desempeño de salto. Por ejemplo, el largo de la tibio-fíbula se relaciona positivamente con el desempeño de salto en diferentes especies de anuros (Zug 1972; Ficetola y De Bernardi 2006).

A pesar de la considerable atención que ha recibido la variación en rasgos de historia de vida en respuesta a factores como la desecación y la densidad larval, escasa atención ha recibido la plasticidad morfológica y la variación en el desempeño locomotor inducida por estos factores. Newman (1989) reportó que individuos de *Scaphiopus couchii*, una especie norteamericana de sapo desértico, crecidos en desecación poseían extremidades posteriores más cortas que individuos crecidos en ambientes menos efímeros. Richter-Boix y col. (2006) encontraron que post-metamórficos de *Pelodytes punctatus* crecidos en desecación aceleraban el desarrollo y alcanzaban la metamorfosis a una menor masa corporal. Además, los post-metamórficos crecidos en desecación tenían tibio-fíbulas más cortas y un menor desempeño de salto que los crecidos sin desecación. Por otra parte, se ha encontrado que la forma y el tamaño de las larvas determinan su desempeño locomotor (Van Buskirk y McCollum 2000; Dayton y col. 2005; Johnson y col. 2008), rasgos que pueden ser afectados por cambios en la temperatura de desarrollo (Wilson y Franklin 1999; Wilson y col. 2000; Arendt y Hoang 2005) o por la presencia de

depredadores (McCollum y Leimberger 1997; Van Buskirk y McCollum 1999; Van Buskirk 2001; Richardson 2002).

Rhinella spinulosa (Anura: Bufonidae) en Chile central se reproduce en pozas temporales de duración variable, y en donde altas mortalidades producidas por la desecación son eventos comunes. Márquez-García y col. (2009, 2010) encontraron que las larvas de esta especie provenientes de Farellones (33°20'S, 70°18'W), Chile central, son capaces de ajustar su tasa de desarrollo en respuesta a las condiciones de desecación. Además, encontraron que el tamaño corporal y el largo de las extremidades posteriores varían en respuesta a la desecación en condiciones naturales (Márquez-García y col. 2009), lo que sugiere que la desecación podría inducir también cambios en el desempeño locomotor de los individuos. Por lo tanto, esta especie es un modelo apropiado para evaluar las consecuencias del desarrollo larval en la morfología y desempeño locomotor de los post-metamórficos. Por las razones dadas anteriormente, esta tesis se orientará a estudiar el efecto de la desecación y densidad larval sobre rasgos de historia de vida, y sobre la morfología y desempeño locomotor en *R. spinulosa* mediante un experimento de jardín común. Este tipo de experimento permite controlar variables asociadas y concomitantes a la desecación, las que son imposibles de controlar en experimentos naturales, permitiendo evaluar el efecto de ambos factores *per-se*. Dado que en anfibios existe evidencia que sugiere que la respuesta de la tasa de crecimiento y desarrollo de las larvas a los factores ambientales puede variar dependiendo del estadio larval (Smith-Gill y Berven 1979; Travis 1984), se evaluó la respuesta inducida por la desecación en dos estadios del desarrollo larval (Gosner 25 y 36). Finalmente, se indagó la existencia de correlación en la respuesta del desempeño locomotor de la larva y el post-metamórfico,

o si existen consecuencias de la variación en el desarrollo larval sobre rasgos del post-metamórfico con el motivo de evaluar el posible desacople entre ambos estadios de historia de vida (larva-post-metamórfico).

HIPOTESIS

1.-Dado que en anfibios que se desarrollan en pozas temporales se ha descrito que la desecación y la densidad larval producen variación en el tiempo a la metamorfosis, tamaño a la metamorfosis, tasa de crecimiento y en la sobrevivencia de los individuos, y que la respuesta fenotípica de las larvas frente a estos factores depende del estadio larval, se espera que:

H₁: Las larvas de *R. spinulosa* crecidas en condiciones de densidad larval alta y de desecación desde el comienzo del desarrollo larval (Gosner 25) tengan una menor tasa de crecimiento, demoren más tiempo en completar la metamorfosis y realicen la metamorfosis a un tamaño menor en comparación a las larvas crecidas en densidad baja y sin desecación.

2.- Dado que la desecación y la densidad larval pueden producir variación morfológica en las larvas y en los post-metamórficos, y que esta variación morfológica a su vez puede determinar diferencias en el desempeño locomotor, se espera que:

H₂: Las larvas crecidas en condiciones de densidad larval alta y de desecación tengan una cola más pequeña y un menor desempeño de nado, en comparación a las larvas crecidas en ausencia de estas variables. Por otra parte, se espera que los post-metamórficos crecidos en desecación presenten extremidades posteriores más cortas y menores distancias de salto que los post-metamórficos crecidos sin desecación.

HIPOTESIS

3.- Dado que en organismos con ciclos de vida complejos la metamorfosis puede producir la evolución independiente de diferentes estadios de historia de vida, permitiendo que los estadios pre y post-metamórfico se adapten independientemente a su respectivo ambiente, se espera que:

H₃: El desempeño de nado de la larva no se correlacione con el desempeño de salto del post-metamórfico, encontrándose un desacople del desempeño locomotor entre la larva y el post-metamórfico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la densidad larval y la desecación en rasgos de historia de vida, morfología y en el desempeño locomotor en larvas y post-metamórficos de *R. spinulosa* provenientes de la localidad de Farellones.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el efecto de la desecación y densidad larval sobre el tiempo, tamaño a la metamorfosis, tasa de crecimiento y sobrevivencia.

Comparar la variación morfológica en larvas y post-metamórficos crecidos en condiciones contrastantes de desecación y densidad larval.

Establecer la existencia de diferencias en el desempeño locomotor de larvas y post-metamórficos crecidos en condiciones contrastantes de desecación y densidad.

Determinar si el desempeño de nado de las larvas se correlaciona con el desempeño de salto de los post-metamórficos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento de jardín común

Se utilizaron tres puestas de huevos de *R. spinulosa* provenientes de pozas naturales presentes en la localidad de Farellones (33°20'S, 70°18'W), recolectadas en octubre del 2010. Las puestas fueron transportadas al laboratorio, donde fueron mantenidas en recipientes de 2000 ml hasta el momento de la eclosión. Las larvas fueron mantenidas a 20°C, con fotoperiodo 12L:12O, y aireación mediante burbujeo. El experimento de jardín común se inició cuando las larvas llegaron al estadio Gosner 25.

Para determinar el efecto de la desecación y la densidad larval en los atributos a evaluar se diseñó un experimento factorial 3x2 con dos factores, que definió seis tratamientos: tres tratamientos de desecación, cada uno realizado en densidad larval alta y en densidad larval baja (Figura 1). Se comparó la respuesta fenotípica inducida en dos estadios del desarrollo larval, los estadios 25 y 36 Gosner. En dos de los tres tratamientos de desecación se crecieron larvas aisladas en dos volúmenes de agua, 200 ml (sin desecación) y 100 ml (desecación desde el estadio Gosner 25), que se mantuvieron constantes durante todo el experimento. El tercer tratamiento de desecación consistió en crecer larvas aisladas inicialmente en 200 ml de agua, y en el momento en que cada larva llegó al estadio Gosner 36 se disminuyó en 100 ml el volumen inicial (desecación desde el estadio Gosner 36).

Debido la denso-dependencia del crecimiento y desarrollo larval (Wilbur y Collins 1973), y con el objetivo de realizar correlaciones fenotípicas entre diferentes fases de

vida, todas las larvas fueron crecidas individualmente. De acuerdo a lo anterior, para generar el tratamiento de densidad larval alta cada larva fue estimulada indirectamente. Con esta finalidad, se utilizó el agua proveniente de recipientes (25 x 15 x 7,5 cm) con 50 larvas /litro (densidad similar a la encontrada en pozas naturales con alta densidad larval), los que fueron mantenidos adicionalmente a los tratamientos del experimento de jardín común. Con el fin de eliminar desechos (restos de comida, heces), el agua de estos recipientes fue filtrada por vacío cada una semana. Posteriormente a cada filtración, se agregó un volumen determinado del líquido obtenido a las larvas del experimento de jardín común que fueron asignadas a los tratamientos de densidad alta. El volumen de líquido agregado dependió por lo tanto del tratamiento de desecación (i.e. 100 ó 200 ml). Dado que las larvas aisladas solo percibieron señales químicas que se encuentran en su ambiente, consideraremos el término infoquímico (Klaschka 2008) para referirnos al agua proveniente de los recipientes con densidad larval alta. Por otra parte, se consideró como densidad larval baja a las larvas creciendo en ausencia de infoquímico, es decir, sólo en agua declorada.

Las unidades experimentales consistieron en cajas plásticas de 12 x 8 x 6 cm con 100 ml ó 200 ml de agua declorada o infoquímico (dependiendo del tratamiento de desecación y densidad), en las cuales las larvas crecieron aisladamente (una larva por caja) durante todo el experimento. Cada tratamiento fue replicado 45 veces, utilizando 15 larvas seleccionadas al azar desde cada puesta, con un total de 270 larvas. Este procedimiento permitió controlar por efectos maternos entre familias (Márquez-García y col. 2010). Las larvas fueron mantenidas a 20°C, con fotoperiodo 12L:12O, aireación por burbujeo y alimentadas con lechuga cocida *ad libitum*. El agua de los recipientes fue cambiada

dos veces por semana. Durante cada cambio de agua los recipientes individuales fueron reordenados al azar. Las larvas que murieron durante las dos primeras semanas del experimento fueron reemplazadas por larvas escogidas al azar desde las puestas iniciales. Posteriormente a las dos semanas ninguna larva fue reemplazada.

Rasgos de historia de vida

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los rasgos de historia de vida, se determinó el tamaño (SVL) y el tiempo a la metamorfosis (estadio Gosner 46), y la tasa de crecimiento de cada individuo, como la razón entre el SVL y el tiempo a la metamorfosis. Además, se determinó la sobrevivencia como el porcentaje de individuos que completaron la metamorfosis por tratamiento.

Desempeño locomotor

Se utilizaron las mismas larvas del experimento de jardín común en las pruebas de desempeño locomotor. Cuando cada larva alcanzó el estadio Gosner 38, se le midió su velocidad de nado. Posteriormente, cuando estas larvas completaron la metamorfosis, se midió la distancia de salto de cada post-metamórfico (Figura 2). Por lo tanto, se usaron los mismos individuos en la medición del desempeño de la larva y del post-metamórfico, lo que nos permitió evaluar la existencia de un posible desacople entre el desempeño locomotor de la larva y del post-metamórfico. La diferencia entre el número de individuos a los que se les determinó la velocidad de nado y la distancia de salto se debió a que hubo larvas que murieron antes de completar la metamorfosis.

Velocidad de nado de la larva. Se determinó la velocidad de nado de 207 larvas en estadio Gosner 38. Para esto, se confeccionó un sistema que consistió en un recipiente de 75 x 40 x 15 cm lleno con 35 L de agua a 20°C, y un tubo de vidrio central de 60 cm

de largo y 2,5 cm de diámetro. Éste poseía una pequeña cámara instalada en un extremo, por donde se introdujo cada larva. La cámara constaba de 2 electrodos activados mediante un interruptor manual, lo que permitió estimular eléctricamente (9 V) el nado de las larvas. Las mediciones se realizaron registrando el tiempo (s) que cada larva demoró en recorrer 40 cm del tubo mediante un cronómetro digital (Sallaberry com. Pers.; Jiménez 2008; Figura 2.a). Entonces la velocidad de nado se calculó como la razón entre la distancia recorrida (40 cm) y el tiempo que demoraron en recorrer esa distancia. Se realizaron tres mediciones por larva, esperando diez minutos entre cada intento. A continuación, cada larva fue fotografiada en una caja de vidrio de 4 x 4 x 8 cm, y devuelta a su tratamiento original. No se observó en ninguna oportunidad que este procedimiento finalizara en la muerte de alguna larva.

Distancia de salto del post-metamórfico. Se determinó la distancia de salto de 153 post-metamórficos. Este procedimiento se realizó dos días después de que cada individuo completó la metamorfosis. Para la medición (20°C) se hizo saltar a cada post-metamórfico sobre papel milimetrado, presionando el urostilo con un pincel para estimular los saltos (Figura 2.b). Las series de saltos fueron grabadas con una cámara fotográfica *NIKON*. Una vez que terminó esta prueba los post-metamórficos fueron sacrificados mediante una solución de MS-222 (metanosulfonato de tricaina) al 0,02% y fijados en etanol 70%. Posteriormente, las series fueron representadas en papel milimetrado a partir de los videos reproducidos en el software Kinovea. Finalmente, se midió la distancia entre saltos consecutivos con un pie de metro digital, tomando en cuenta los saltos realizados durante los primeros 30 segundos de cada serie, por individuo.

Mediciones morfológicas

Morfología de las larvas. Se tomaron ocho medidas morfológicas (Figura 3) de 191 larvas desde las fotografías tomadas posteriormente a la prueba de nado. Para esto se utilizó el programa Image Tool 3. Las medidas tomadas fueron: largo del cuerpo, altura máxima del cuerpo y de la cola, largo de la cola, altura de la base de la cola, ancho entre los ojos, ancho del cuerpo y ancho de la base de la cola. Se consideraron las mediciones de la cola debido a que se ha reportado anteriormente que la morfología de la cola puede influir en el desempeño de nado de las larvas (Van Buskirk y McCollum 2000).

Morfología de los Post-metamórficos. Se tomaron doce medidas morfológicas (Figura 4) de 181 post-metamórficos mediante una lupa con ocular micrométrico, utilizando los individuos muestreados después de la prueba de salto. Las medidas tomadas fueron: largo desde la boca a la cloaca (SVL), ancho de la cabeza, alto de la cabeza, ancho de la mandíbula, distancia de la nariz a la cabeza, distancia entre narinas, diámetro del ojo, ancho entre los ojos, largo de la extremidad anterior, largo del fémur, largo de la tibio-fíbula y largo del tarso-metatarso más las falanges (pie). Se incluyeron también mediciones de la cabeza porque se ha documentado que el desarrollo larval afecta el ritmo y la secuencia de osificación craneal en anfibios (Smirnov 1992).

Análisis estadístico

Se detectaron distribuciones no normales y heterocedasticidad en los datos. Por lo tanto, éstos fueron transformados a Log_{10} para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Por otra parte, el tratamiento con desecación desde el estadio Gosner 25 y densidad alta resultó en la mayoría de las larvas muertas. Debido a esto, los datos obtenidos de las tres familias fueron agrupados en todos los tratamientos, con la

finalidad de obtener un número de observaciones que permitiera realizar comparaciones entre ellos. En todos los ANOVA y ANCOVA realizados se utilizó la desecación (tres niveles) y la densidad larval (dos niveles) como variables categóricas.

Rasgos de historia de vida. Se utilizó ANOVA factorial para determinar el efecto de los tratamientos sobre el tiempo y tamaño a la metamorfosis, y sobre la tasa de crecimiento. El análisis de la sobrevivencia se realizó mediante una prueba de Chi-cuadrado.

Variación morfológica. La variación en los atributos morfológicos de las larvas fue determinada mediante un análisis de covarianza multivariado (MANCOVA) usando el largo total como covariado, seguido por el análisis univariado de cada rasgo (ANCOVA). En el caso de los post-metamórficos se hizo el mismo procedimiento utilizando el SVL como covariado. Además, para determinar si el largo de la tibio-fíbula se ajustó al tamaño corporal se realizó un análisis de correlación entre ambas variables.

Variación en el desempeño locomotor. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el desempeño locomotor se realizó ANOVA factorial para la velocidad de nado de las larvas y la distancia de salto de los post-metamórficos. Posteriormente se determinó el efecto de los tratamientos en el desempeño locomotor independientemente del tamaño corporal realizando ANCOVA, controlando por el largo total de las larvas en el caso de la velocidad de nado y por el SVL de los post-metamórficos en el caso de la distancia de salto. En estos análisis se utilizó el promedio de las tres velocidades de nado y de las tres distancias de salto mayores registradas, por individuo.

Correlaciones. Se determinó si existió correlación entre el tiempo de nado y el ancho del cuerpo. El mismo análisis fue realizado con el desempeño de salto, el SVL y el largo de

la tibia-fibula. Finalmente se determinó si existió correlación entre la distancia de salto y la velocidad de nado, y entre el desempeño de salto y la tasa de crecimiento.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc., 2001), utilizando un $\alpha=0,05$.

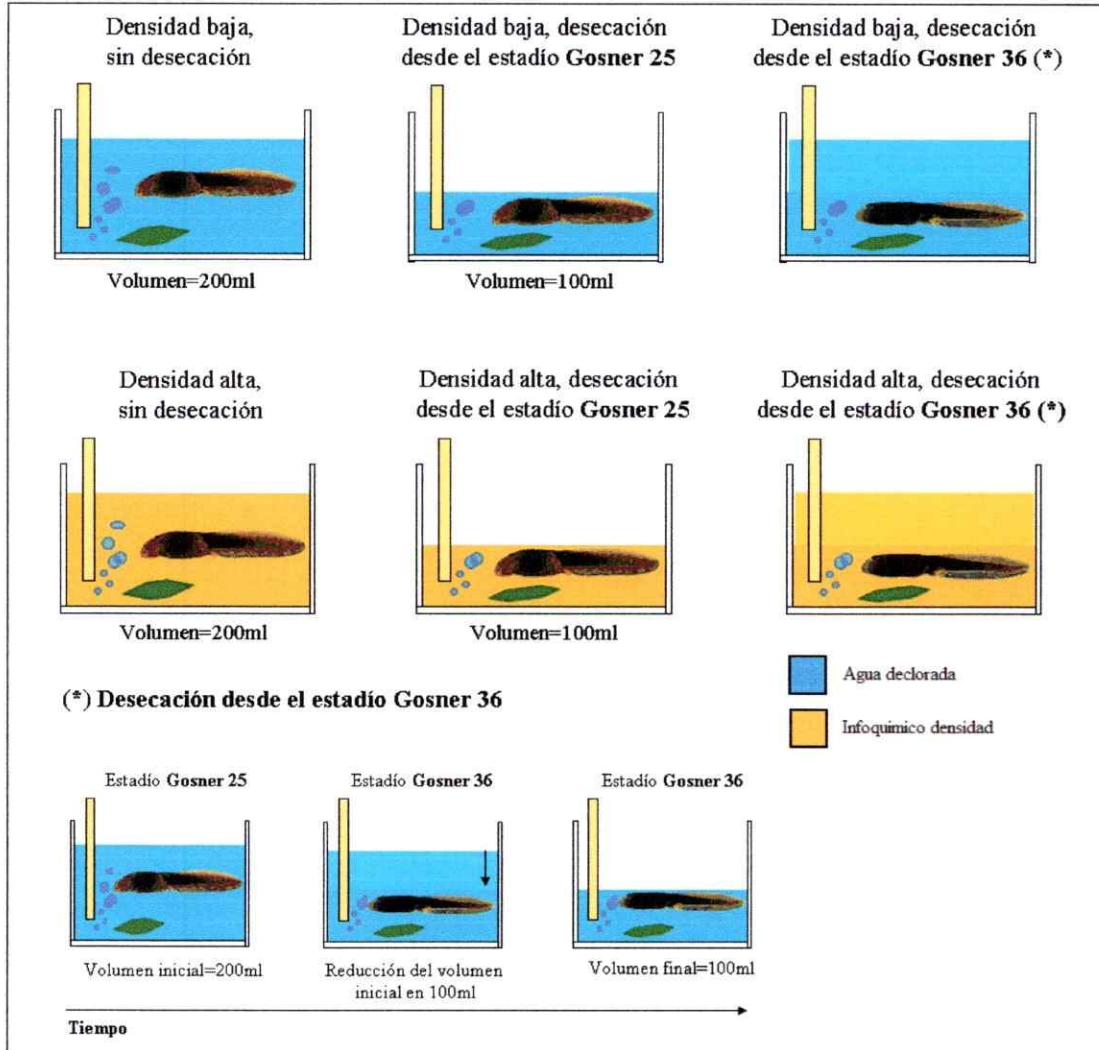


Figura 1. Esquema de los tratamientos realizados en el experimento de jardín común. El experimento de jardín común comenzó en el momento que las larvas llegaron al estadio Gosner 25. Nótese que de los seis tratamientos, los cuatro primeros mantienen un volumen constante de agua o infoquímico. En los dos últimos tratamientos, donde se evalúa la desecación desde el estadio Gosner 36, las larvas inicialmente crecen en 200 ml, pero en el momento que llegan al estadio Gosner 36 se disminuye el volumen inicial a 100 ml (ver parte inferior del esquema). Se utilizaron 45 larvas por tratamiento. Independientemente del tratamiento las larvas se desarrollaron aisladamente hasta la metamorfosis.

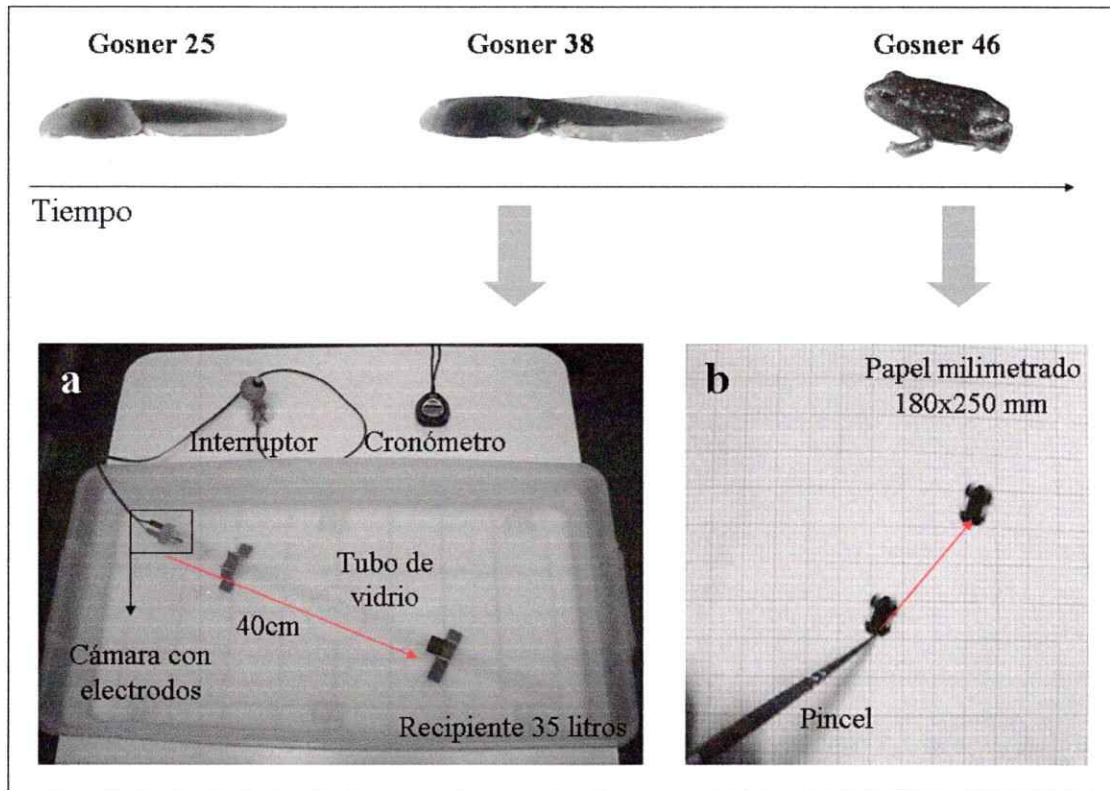


Figura 2. Esquema de la medición del desempeño locomotor en las larvas y en los post-metamórficos. A cada larva del experimento del jardín común se le midió el tiempo de nado (a) cuando llegaron al estadio Gosner 38 y la distancia de salto (b) cuando completaron la metamorfosis (Gosner 46). Las líneas rojas indican la trayectoria recorrida por los individuos en ambas pruebas. Todas las mediciones del desempeño locomotor fueron realizadas a 20°C.

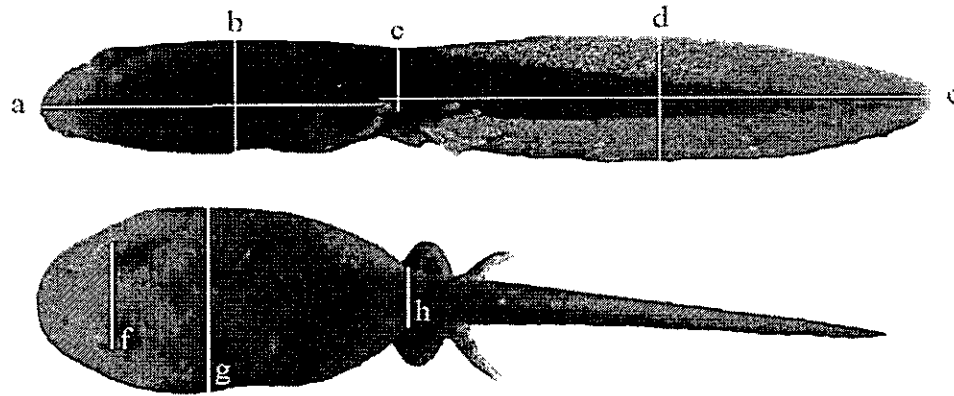


Figura 3. Mediciones morfológicas realizadas a las larvas estadio Gosner 38. Las variables medidas fueron: Largo del cuerpo (a), altura máxima del cuerpo (b), largo de la cola (c), altura máxima de la cola (d), altura de la base de la cola (e), ancho entre los ojos (f), ancho del cuerpo (g) y ancho de la base de la cola (h).

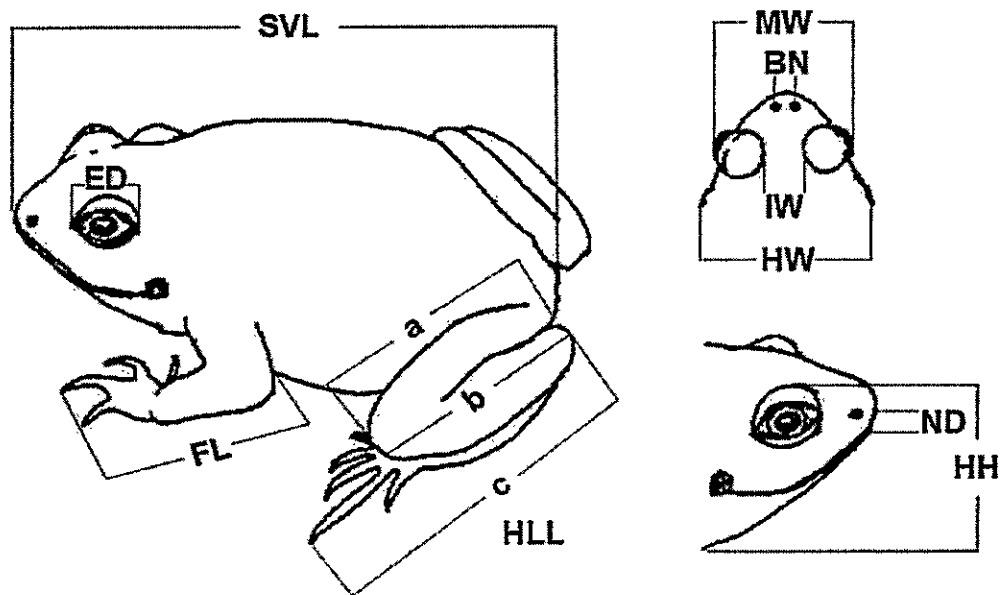


Figura 4. Mediciones morfológicas realizadas a los post-metamórficos. Las variables medidas fueron: Largo desde la boca a la cloaca (SVL), ancho de la cabeza (HW), alto de la cabeza (HH), ancho de la mandíbula (MW), distancia de la nariz a la cabeza (ND), distancia entre narinas (BN), diámetro del ojo (ED), ancho entre los ojos (IW), largo de la extremidad anterior (FL), largo del fémur (a), largo de la tibio-fíbula (b) y largo del tarso-metatarso con las falanges (c). Extraído de Méndez y col, 2009.

RESULTADOS

Rasgos de historia de vida

La interacción entre la densidad larval y la desecación explicó el aumento del tiempo a la metamorfosis ($F_{2,177}=10,724$; $p<0,0001$; ANOVA) y la disminución de la tasa de crecimiento ($F_{2,177}=4,116$; $p=0,0179$; ANOVA). Las comparaciones *a posteriori* (Test de Tukey) mostraron que las larvas crecidas en densidad alta y con desecación desde el estadio Gosner 25 fueron las que tuvieron el mayor tiempo a la metamorfosis y la menor tasa de crecimiento (Tabla 1; Figura 6). El tamaño corporal fue menor para los post-metamórficos crecidos en densidad larval baja y en desecación desde el estadio Gosner 36, pero esta diferencia no fue significativa ($F_{2,177}=2,984$; $p=0,0531$; ANOVA). No se encontró correlación entre el tiempo a la metamorfosis y el SVL (Tabla 4). Finalmente, se encontró que la sobrevivencia a la metamorfosis fue diferente entre los tratamientos ($p=0,001$; g.l.=3; $\chi^2=15,931$), siendo menor para las larvas crecidas en densidad larval alta y en desecación desde el estadio Gosner 25 (Figura 5).

Variación morfológica en las larvas

El análisis multivariado (MANCOVA) mostró que solo la densidad larval tuvo un efecto significativo sobre las variables morfológicas de las larvas independientemente de su largo total (Tabla 2). El análisis univariado (ANCOVA) y las comparaciones *a posteriori* (Test de Tukey) mostraron que el ancho relativo del cuerpo, el ancho relativo de la cola en la base y el ancho relativo entre los ojos fueron mayores en las larvas

crecidas en densidad larval alta en comparación con las crecidas en densidad larval baja (Tabla 1).

Variación morfológica en los post-metamórficos

El análisis multivariado (MANCOVA) mostró que la interacción entre la densidad larval y la desecación tuvo un efecto significativo sobre las variables morfológicas de los post-metamórficos independientemente de su SVL (Tabla 3). El análisis univariado (ANCOVA) mostró el mismo resultado para el alto de la cabeza, el ancho de la mandíbula, el ancho de la cabeza, la distancia entre las narinas y para el largo de la tibio-fíbula. Por otra parte, se encontró que solamente la desecación tuvo un efecto sobre el largo del tarso-metatarso independientemente del SVL.

Se encontró que el alto y ancho relativo de la cabeza, el ancho relativo de la mandíbula y la distancia relativa entre narinas fueron de menor tamaño en los individuos crecidos en densidad baja y en presencia de desecación, con respecto a los individuos crecidos en densidad baja y sin desecación. A su vez, estas variables fueron de mayor tamaño para los individuos crecidos en densidad alta y en presencia de desecación con respecto a los crecidos en densidad alta, pero sin desecación (Figura 7). Por otra parte, el largo relativo de la tibio-fíbula y el largo relativo del tarso-metatarso disminuyeron con los tratamientos de desecación, en densidad baja. No se encontró esta tendencia en los individuos crecidos en densidad larval alta (Tabla 1; Figura 7). Este patrón de variación distinto en densidad alta y en densidad baja muestra el efecto de la interacción sobre las variables morfológicas. Finalmente, se obtuvo una correlación positiva entre el SVL y el largo de la tibio-fíbula ($r = 0,6685$; $p < 0,0001$; $N = 182$).

Velocidad de nado de las larvas

Las larvas crecidas en densidad larval alta y en desecación desde el estadio Gosner 25 fueron las que tuvieron en promedio la menor velocidad de nado (Tabla 1; Figura 8). La densidad larval tuvo un efecto sobre la velocidad de nado independientemente del largo total de las larvas ($F_{1,201}=9,6206$; $p=0,0022$; ANCOVA). Además, se encontró una relación negativa y significativa entre la velocidad de nado y el ancho del cuerpo (Tabla 4).

Distancia de salto de los post-metamórficos

Se encontró una correlación positiva entre la distancia de salto y el largo de la tibio-fíbula (Tabla 4). Los post-metamórficos crecidos en densidad baja y en desecación desde el estadio Gosner 36 fueron los que tuvieron la menor distancia de salto (Tabla 1; Figura 8.b). La desecación tuvo un efecto sobre la distancia de salto ($F_{2,147}=5,6021$; $p=0,0045$; ANOVA), pero al corregir por el SVL, estas diferencias no fueron significativas ($F_{2,146}=3,0038$; $p=0,0526$; ANCOVA). Se obtuvo el mismo resultado al corregir por el largo de la tibio-fíbula ($F_{2,146}=0,2677$; $p=0,7655$; ANCOVA). Finalmente no existió correlación entre la velocidad de nado de las larvas y la distancia de salto de los post-metamórficos, pero sí se encontró una correlación positiva y significativa entre la tasa de crecimiento y la distancia de salto (Figura 9; Tabla 4)

Tabla 1. Promedio, error estándar y número muestral para la tasa de crecimiento, ancho del cuerpo (larva), velocidad de nado, largo de la tibio-fíbula y distancia de salto en cada tratamiento experimental. En la última columna se muestra el coeficiente de variación \pm error estándar calculado para cada rasgo siguiendo Merilä y col. 2000. SD: sin desecación; DG25: desecación desde el estadio Gosner 25; DG36: desecación desde el estadio Gosner 36; DB: densidad baja; DA: Densidad alta.

Tasa de crecimiento		Promedio	ES	n	CV \pm ES
SD	DB	0,121	0,004	35	19,761 \pm 1,647
DG25	DB	0,116	0,003	37	
DG36	DB	0,118	0,003	37	
SD	DA	0,093	0,004	36	
DG25	DA	0,069	0,006	11	
DG36	DA	0,094	0,004	24	
Ancho del cuerpo					
SD	DB	5,459	0,088	33	5,027 \pm 0,419
DG25	DB	5,446	0,109	38	
DG36	DB	5,301	0,092	35	
SD	DA	5,829	0,116	37	
DG25	DA	6,037	0,099	14	
DG36	DA	5,796	0,125	33	
Velocidad de nado					
SD	DB	19,116	0,566	40	6,187 \pm 0,516
DG25	DB	17,861	0,488	39	
DG36	DB	17,639	0,441	39	
SD	DA	16,786	0,430	39	
DG25	DA	15,912	0,693	15	
DG36	DA	17,266	0,470	35	
Largo de la tibio-fíbula					
SD	DB	3,229	0,035	35	2,810 \pm 0,234
DG25	DB	3,081	0,035	37	
DG36	DB	2,959	0,033	37	
SD	DA	3,120	0,041	36	
DG25	DA	3,069	0,091	12	
DG36	DA	3,083	0,047	24	
Distancia de salto					
SD	DB	18,155	0,554	32	6,013 \pm 0,501
DG25	DB	16,400	0,644	30	
DG36	DB	15,734	0,593	30	
SD	DA	17,734	0,594	32	
DG25	DA	16,036	1,664	8	
DG36	DA	16,076	0,728	21	

Tabla 2. Resultados de los análisis multivariado (MANCOVA) y univariado (ANCOVA) de covarianza para los caracteres morfológicos de las larvas.

Análisis	Factor	Variable dependiente	Wilks λ	d.f.	MS	F	P
MANCOVA	Largo total	Todos los rasgos	0,0001	8,177		199684,3486	<0,0001
	Densidad		0,8095	8,177		5,2061	<0,0001
	Desecación		0,8961	16,354		1,2471	0,2297
	Interacción		0,9377	16,354		0,7235	0,7701
ANCOVA	Largo total	Ancho del cuerpo		1,184	0,1091	64,4965	<0,0001
	Densidad			1,184	0,0400	23,6279	<0,0001
	Desecación			2,184	0,0003	0,1976	0,8209
	Interacción			2,184	0,0003	0,1574	0,8545
	Largo total	Ancho de la cola		1,184	0,1033	72,5665	<0,0001
	Densidad			1,184	0,0179	12,5931	0,0005
	Desecación			2,184	0,0012	0,8232	0,4407
	Interacción			2,184	0,0012	0,8334	0,4362
	Largo total	Ancho entre ojos		1,184	0,0615	53,5782	<0,0001
	Densidad			1,184	0,0343	29,8767	<0,0001
	Desecación			2,184	0,0027	2,3219	0,1010
	Interacción			2,184	0,0015	1,3175	0,2703

Tabla 3. Resultados de los análisis multivariado (MANCOVA) y univariado (ANCOVA) de covarianza para los caracteres morfológicos de los post-metamórficos.

Análisis	Factor	Variable dependiente	Wilks λ	d.f.	MS	F	p
MANCOVA	SVL	Todos los rasgos	0,3326	12,163		27,2619	<0,0001
	Densidad		0,8114	12,163		3,1577	0,0005
	Desecación		0,7510	24,326		2,0907	0,0024
	Interacción		0,7457	24,326		2,1467	0,0017
ANCOVA	SVL	Diámetro del ojo		1,174	0,0325	42,6367	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0032	4,2502	0,0407
	Desecación			2,174	0,0026	3,4112	0,0352
	Interacción			2,174	0,0006	0,7703	0,4644
	SVL	Largo de la tibia-fíbula		1,174	0,0751	128,4131	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0000	0,0669	0,7963
	Desecación			2,174	0,0028	4,7144	0,0101
	Interacción			2,174	0,0022	3,6943	0,0268
	SVL	Largo del tarso-metatarso		1,174	0,0732	92,2918	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0003	0,3222	0,5710
	Desecación			2,174	0,0024	3,0635	0,0493
	Interacción			2,174	0,0015	1,8564	0,1593
	SVL	Alto de la cabeza		1,174	0,0530	101,7435	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0002	0,4547	0,5010
	Desecación			2,174	0,0011	2,0221	0,1355
	Interacción			2,174	0,0039	7,4249	0,0008
	SVL	Ancho de la mandíbula		1,174	0,0600	284,9637	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0005	2,4667	0,1181
	Desecación			2,174	0,0001	0,3200	0,7266
	Interacción			2,174	0,0015	6,9087	0,0013
	SVL	Distancia entre narinas		1,174	0,0271	44,7737	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0052	8,6436	0,0037
	Desecación			2,174	0,0003	0,5758	0,5633
	Interacción			2,174	0,0060	9,9519	0,0001
	SVL	Ancho de la cabeza		1,174	0,0471	238,1372	<0,0001
	Densidad			1,174	0,0006	3,0393	0,0830
	Desecación			2,174	0,0002	0,8607	0,4247
	Interacción			2,174	0,0009	4,7078	0,0102

Tabla 4. Resultados de los análisis de correlación para las variables analizadas en este trabajo.

Variables		r	t	p	N
SVL	Tiempo la metamorfosis	-0,0113	-0,1517	0,8796	183
SVL	Distancia de salto	0,5981	9,1710	<0,0001	153
Largo de la tibio-fibula	Distancia de salto	0,6140	9,5602	<0,0001	153
Tiempo a la metamorfosis	Distancia de salto	-0,1795	-2,2341	0,0270	152
Tasa de crecimiento	Distancia de salto	0,3331	4,3262	<0,0001	152
Ancho del cuerpo	Velocidad de nado	-0,2439	-3,5027	0,0006	196
Velocidad de nado	Distancia de salto	0,0315	0,3832	0,7021	150

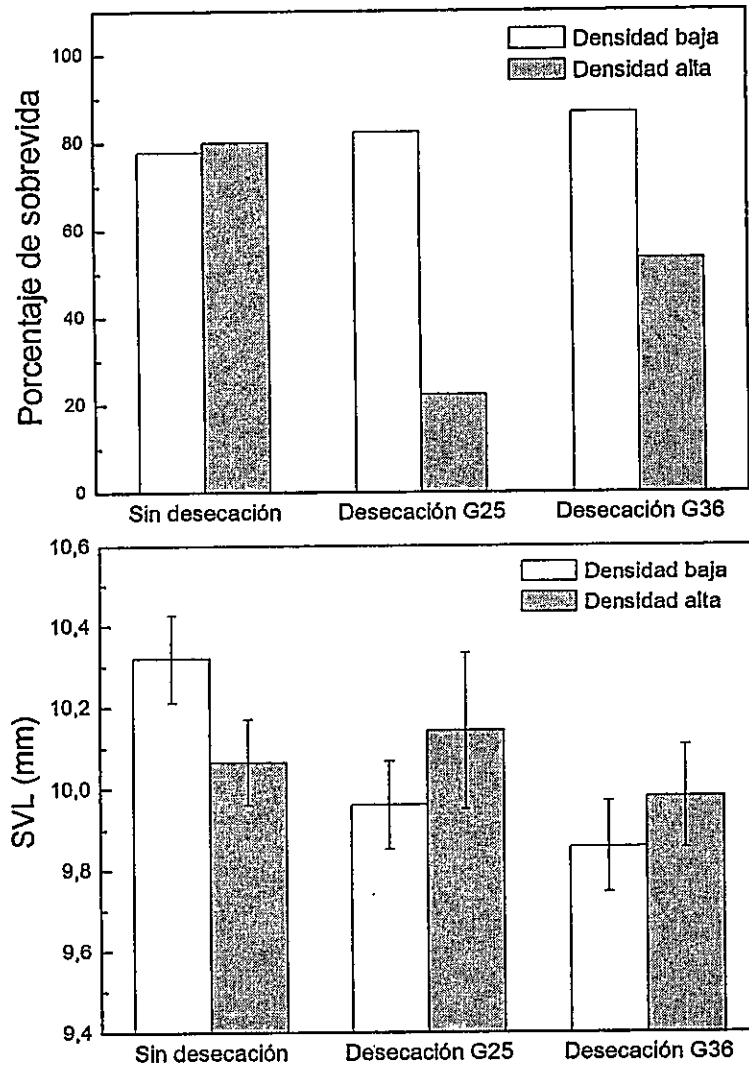


Figura 5. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre el porcentaje de supervivencia (arriba) y el tamaño a la metamorfosis (SVL; abajo) de los individuos. Las barras denotan el error estándar. Desecación G25 y G36 representan la presencia de desecación desde el estadio Gosner 25 y 36 respectivamente.

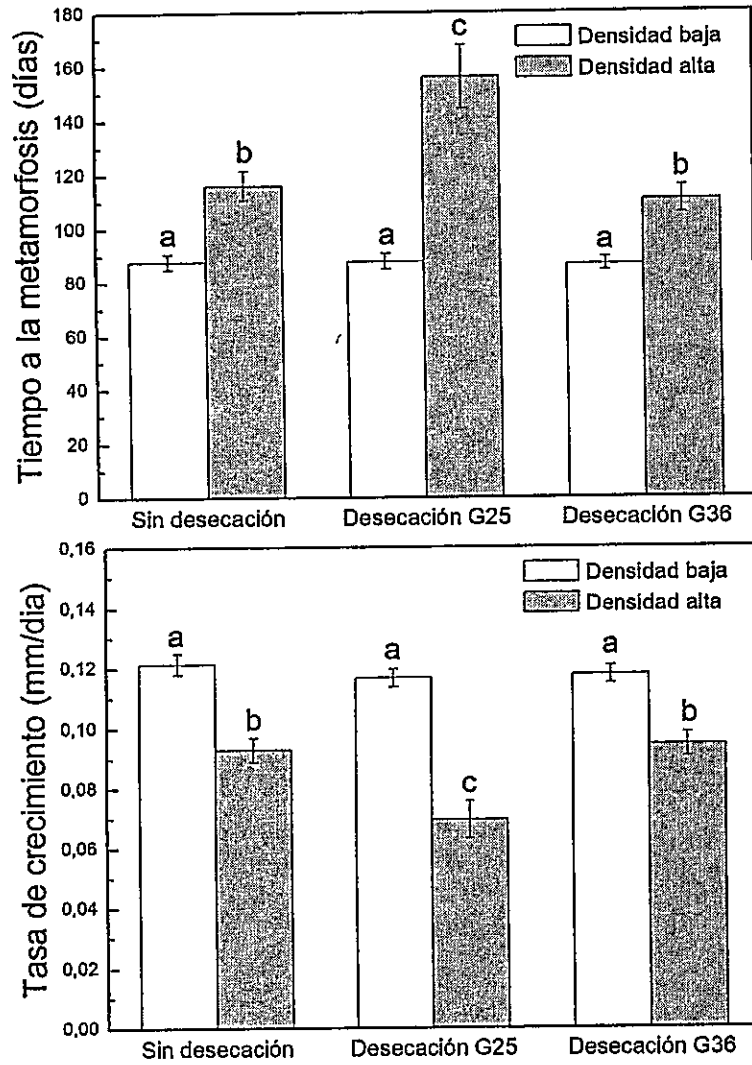


Figura 6. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre el tiempo a la metamorfosis (arriba) y la tasa de crecimiento (abajo) de las larvas. Las barras denotan el error estándar y las letras muestran las diferencias significativas ($p < 0,05$) encontradas en el test de Tukey. Desecación G25 y G36 representan la presencia de desecación desde el estadio Gosner 25 y 36 respectivamente.

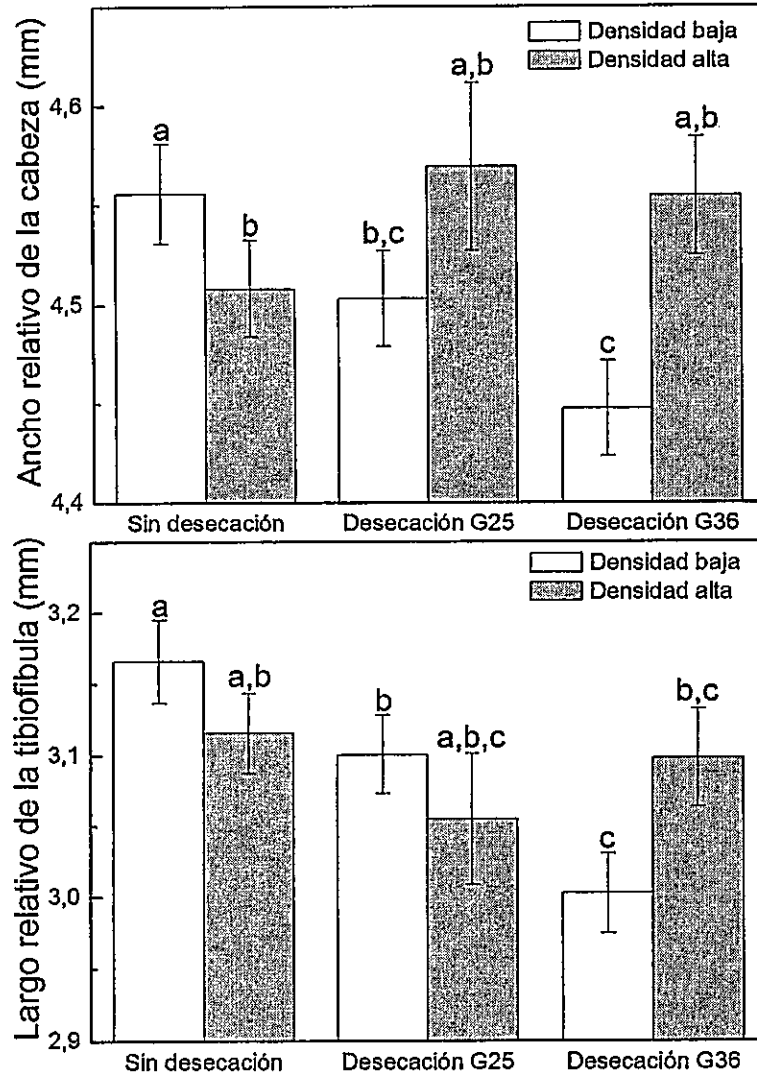


Figura 7. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre el ancho relativo de la cabeza (arriba) y el largo relativo de la tibio-fibula (abajo) de los post-metamórficos. Las barras denotan el error estándar y las letras muestran las diferencias significativas ($p < 0,05$) encontradas en el test de Tukey. Desecación G25 y G36 representan la presencia de desecación desde el estadio Gosner 25 y 36 respectivamente.

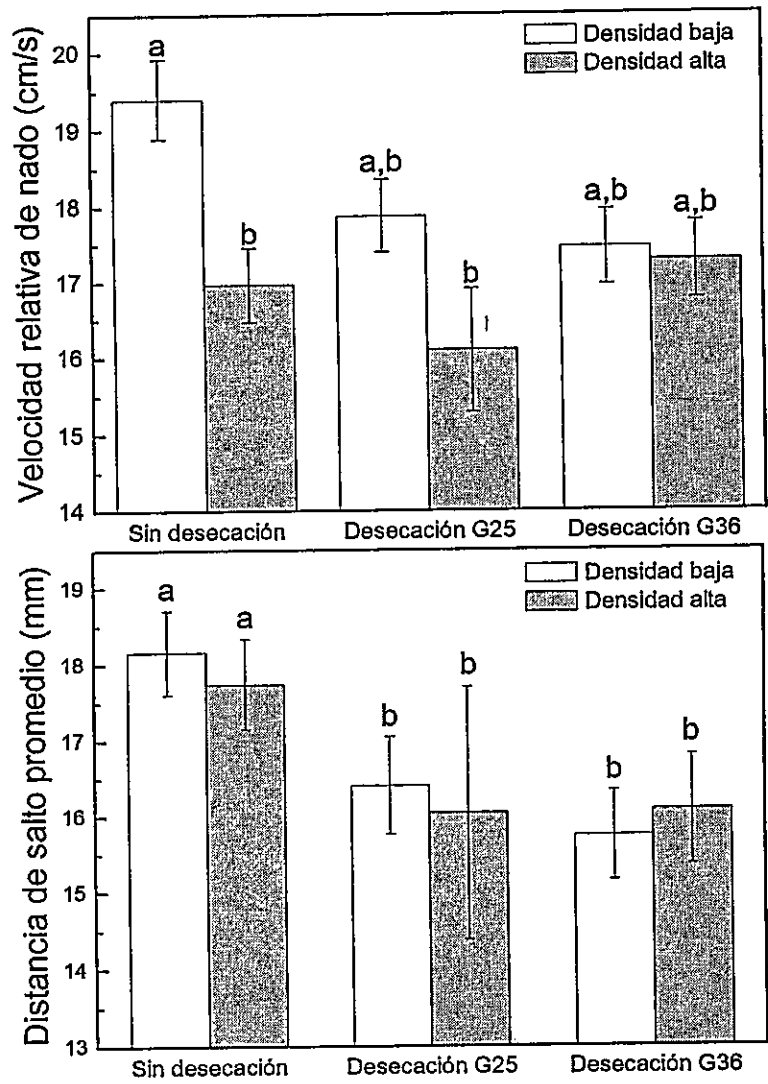


Figura 8. Efecto de la desecación y la densidad larval sobre la velocidad relativa de nado de las larvas (arriba) y sobre la distancia de salto de los post-metamórficos (abajo). Las barras denotan el error estándar y las letras muestran las diferencias significativas ($p < 0,05$) encontradas en el test de Tukey. Desecación G25 y G36 representa la presencia desecación desde el estadio Gosner 25 y 36 respectivamente.

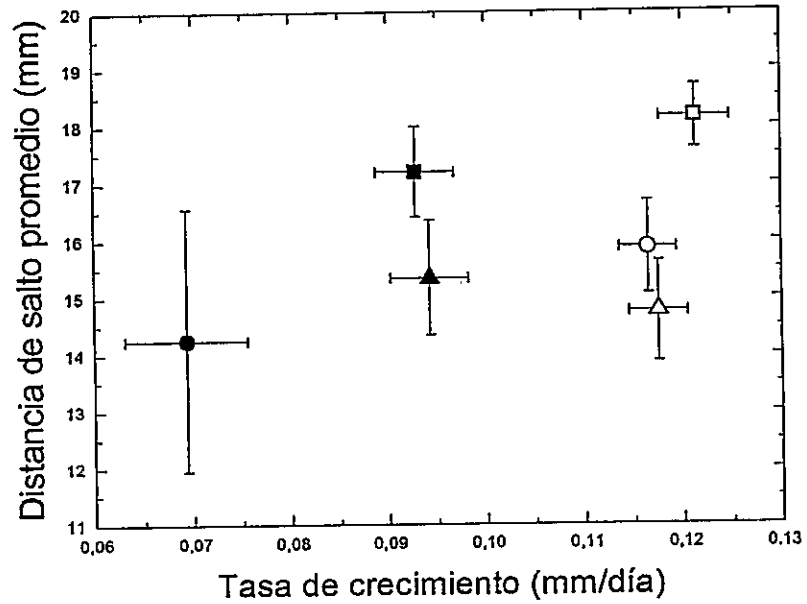


Figura 9. Correlación entre la tasa de crecimiento y la distancia de salto de los individuos en los diferentes tratamientos experimentales. Los cuadrados indican los tratamientos sin desecación, los círculos indican los tratamientos de desecación desde el estadio Gosner 25 y los triángulos indican los tratamientos con desecación desde el estadio Gosner 36. Los símbolos vacíos indican los tratamientos en densidad larval baja y los símbolos llenos indican los tratamientos en densidad larval alta.

DISCUSIÓN

En anfibios, la duración del período larval varía considerablemente tanto inter como intra-específicamente (Denver 1997). En ambientes efímeros se predice que a medida que el riesgo de mortalidad en el ambiente larval aumenta en función del tiempo, se favorece una aceleración del desarrollo larval en desmedro de las consecuencias asociadas a un tamaño menor a la metamorfosis (Werner 1986). Por lo tanto, una tasa de desarrollo plástica es considerada adaptativa en este tipo de ambientes debido a la heterogeneidad de las condiciones ambientales (Wilbur y Collins 1973).

Márquez-García y col. (2009, 2010) encontraron que las larvas de *R. spinulosa* provenientes de Farellones son capaces de acelerar el desarrollo en respuesta a la desecación de las pozas en las cuales se desarrollan. Sin embargo, en estos experimentos no quedó del todo claro si la desecación *per-se* produjo la respuesta observada en las larvas. Esto debido a que la desecación gatilla una serie de cambios ambientales como por ejemplo incrementos en la temperatura del agua (Newman 1989), incrementos de la densidad larval (Griffiths 1997) y cambios en la concentración de solutos (Denver 1997), que se expresan al mismo tiempo. Entonces, a pesar del realismo que proveen los experimentos de campo, no permiten la regulación de variables independientes que podrían afectar la respuesta de los individuos.

El experimento de jardín común realizado en esta tesis permitió evaluar la respuesta de las larvas individuales frente a una disminución del volumen inicial (de agua) en diferentes estadios larvales, a dos densidades, pero manteniendo constante la

temperatura a la cual se desarrollaron las larvas. Nuestros resultados muestran que las larvas de *R. spinulosa* no aceleran el desarrollo larval en respuesta a una reducción del volumen de agua, en ninguno de los estadios larvales evaluados. Márquez-García y col. (2010) sugieren que la variación de la temperatura diaria del agua en las pozas puede ser una señal fehaciente de la desecación inminente del hábitat para las larvas de *R. spinulosa*. Más aun, se ha encontrado que en condiciones de jardín común las larvas de esta misma especie provenientes de Farellones se desarrollan más rápidamente a 25°C que a 20°C, pero realizan la metamorfosis a un tamaño similar (Méndez y Correa-Solís 2010). Dado que en nuestro experimento de jardín común al controlar la temperatura no se observó una aceleración de la metamorfosis, y en base a los antecedentes existentes, es posible postular que en condiciones naturales las diferencias en la variación de la temperatura de las pozas puede ser la variable ambiental que se relacionaría con la aceleración en la tasa de desarrollo en *R. spinulosa*, como propone Márquez-García y col. (2010).

Estudios previos han encontrado que incrementos en la densidad larval prolonga el período larval, reduce el tamaño de los post-metamórficos y reduce la probabilidad de una metamorfosis exitosa (revisado en Berven y Gill 1983).

En esta tesis se encontró que las larvas de *R. spinulosa* crecidas en densidad larval alta tuvieron un período larval más largo y un crecimiento más lento que las crecidas en densidad larval baja. A pesar de esto, las larvas de los diferentes tratamientos alcanzaron un tamaño similar a la metamorfosis (i.e. las larvas que demoraron un mayor tiempo en completar la metamorfosis no crecieron adicionalmente en comparación con las que tuvieron un menor tiempo a la metamorfosis). Esto es concordante con la ausencia de

correlación entre el tamaño y el tiempo a la metamorfosis, y podría ser explicado por la diferencia en la plasticidad de ambos rasgos ($SVL=1,615\pm 0,135$, Tiempo met. $=25,120\pm 2,093$; Coeficiente de variación \pm Error estándar). Estos resultados sugieren la existencia de un tamaño mínimo a la metamorfosis (Wilbur y Collins 1973) para esta especie.

En particular las larvas crecidas en el tratamiento de desecación desde el estadio Gosner 25 en densidad larval alta tuvieron la menor tasa de crecimiento y la menor sobrevivencia a la metamorfosis. En este caso, la baja tasa de crecimiento de las larvas resultó en pocos individuos capaces de alcanzar el tamaño mínimo para realizar la metamorfosis (Wilbur 1977) en comparación con los otros tratamientos. Al comparar éstas con las larvas crecidas en densidad alta y desecación desde el estadio Gosner 36, se puede notar que la magnitud en la respuesta del tiempo a la metamorfosis y de la tasa de crecimiento es diferente, siendo mayor en las crecidas en densidad larval alta y en desecación desde el estadio Gosner 25. Esto apoyaría nuestra predicción que plantea que la respuesta en los rasgos de historia de vida dependería del estadio larval en el cual ocurren los cambios ambientales. Resultados semejantes reportó Travis (1984), quien trabajando con *H. gratiosa* encontró que una disminución de la tasa de crecimiento de los individuos al comienzo del desarrollo larval prolongó el período larval en mayor magnitud en comparación con las larvas que experimentaban una disminución de la tasa de crecimiento en estadios larvales más avanzados.

Trabajos anteriores que han evaluado la plasticidad morfológica y en el desempeño locomotor de las larvas de anfibios se han enfocado principalmente en la respuesta frente a cambios en la temperatura de desarrollo (Wilson y Franklin 1999; Wilson y col. 2000;

Arendt y Hoang 2005) o la presencia de depredadores (McCollum y Leimberger 1997; Van Buskirk y McCollum 1999; Van Buskirk 2001; Richardson 2002), siendo escasos los trabajos que han tratado el efecto de la densidad larval sobre la morfología de las larvas (e.g. Collins y Cheek 1983; Relyea 2002).

En esta tesis se encontró que la densidad alta indujo larvas con cuerpo y cola más anchos que las larvas crecidas en densidad baja. De modo similar, la densidad alta produjo una disminución en la velocidad de nado de las larvas, con respecto a las crecidas en densidad larval baja. Probablemente la variación en el tiempo a la metamorfosis y en la tasa de crecimiento inducida en este caso por la densidad larval tuvo un efecto en la velocidad de nado de las larvas, como indica Arendt (2003) quien encontró una relación negativa entre la velocidad de nado y la tasa de crecimiento en larvas de *Bufo americanus* y *Scaphiopus hammondi*.

Además, se encontró una correlación entre la velocidad de nado y la morfología de las larvas: las larvas con cuerpo más ancho nadaron más lentamente que las larvas con cuerpo delgado. Sin embargo, esta correlación fue baja y por ende explicó poca cantidad de la variación en la velocidad de nado (6%). Arendt (2010) sugiere que los análisis morfométricos lineales de la morfología larval explican una baja cantidad de la variación en la velocidad de nado, en comparación con análisis morfométricos geométricos. Por lo tanto, análisis de la morfología larval utilizando morfometría geométrica proveerían una mejor aproximación para evaluar cómo y qué rasgos afectarían la velocidad de nado de las larvas de *R. spinulosa*.

Los resultados de esta tesis muestran que la densidad durante el desarrollo larval parece ser un factor que determina diferencias tanto morfológicas como fisiológicas en las

larvas de *R. spinulosa*. A pesar de que trabajos anteriores sugieren que a altas densidades larvales ocurre competencia intraespecífica entre los individuos, lo que a su vez produce la prolongación del período larval y la disminución del tamaño a la metamorfosis (Wilbur y Collins 1973; Wilbur 1977, 1987), la metodología utilizada en este experimento (i.e. infoquímico) no nos permitió establecer si el efecto de la densidad larval fue causado por la ocurrencia de competencia o por otros factores, como la acumulación de desechos nitrogenados y/o heces. Por lo tanto, nuevos experimentos son requeridos para determinar si la competencia entre las larvas de *R. spinulosa* produce un aumento en el tiempo a la metamorfosis y variación morfológica, como se ha encontrado en esta tesis.

Se sabe que las condiciones ambientales pueden inducir variación morfológica simplemente provocando variaciones en la tasa de desarrollo y crecimiento (Blouin y Loeb 1991; Blouin y Brown 2000). Un ejemplo interesante ocurre cuando la tasa a la cual dos animales alcanzan un tamaño corporal dado determina su forma a ese tamaño. Entonces la relación entre la forma y el tamaño corporal no es constante, sino que es función de la tasa de desarrollo (i.e. cambios en el crecimiento total no afectan la tasa de crecimiento de todas las partes corporales proporcionadamente). Por lo tanto, este tipo de variación morfológica podría ser importante en anfibios debido a que su crecimiento puede ser influenciado por muchos factores ambientales.

Nuestros resultados muestran variación morfológica tamaño-independiente inducida ambientalmente en la cabeza y en las extremidades posteriores de los post-metamórficos de *R. spinulosa*. Newman (1989) y Márquez-García y col. (2009) encontraron que los individuos crecidos en el tratamiento de desecación alta poseían cabezas más pequeñas y

extremidades posteriores más cortas, que los crecidos en el tratamiento de desecación baja. Los resultados de esta tesis son similares a lo encontrado por Newman (1989) y Márquez-García y col. (2009), debido a que se encontró que en densidad larval baja los post-metamórficos crecidos en el tratamiento de desecación tenían cabezas más pequeñas y extremidades posteriores más cortas que los crecidos en ausencia de desecación. Por otra parte, en densidad larval alta encontramos que la presencia de desecación tuvo un efecto diferente al que tuvo en densidad larval baja. Esto es sugerido por los análisis estadísticos, que detectaron que la interacción entre la desecación y la densidad larval influye en la expresión del ancho de la cabeza y largo de la tibio-fíbula. A nuestro saber, esta respuesta contrastante de estos rasgos morfológicos frente a ambos factores en interacción no ha sido reportada en trabajos anteriores. Se considera que el ancho de la cabeza y el largo de las extremidades posteriores son rasgos importantes funcionalmente en anuros, debido a que la variación en éstos puede afectar su alimentación (Emerson 1985) y desempeño locomotor (Emerson 1978). Sin embargo, no es claro si las diferencias morfológicas encontradas en los post-metamórficos de mantienen hasta la adultez, debido a que en anfibios la mayor parte del crecimiento ocurre en la fase terrestre.

Encontramos que la desecación tuvo un efecto significativo sobre la distancia de salto de los post-metamórficos. Al corregir por el tamaño corporal (SVL) el efecto de la desecación no fue significativo, lo que sugiere que las diferencias en la distancia de salto encontradas inicialmente se debieron a diferencias en el SVL de los individuos. En otras especies se ha encontrado que diferencias en el desempeño locomotor estuvieron dadas

por diferencias en el tamaño o en la masa corporal (*Bufo woodhousii*, John-Alder y Morin 1990; *Bufo terrestris*, Beck y Congdon 2000).

A pesar de que se encontró una relación significativa entre el SVL y el desempeño de salto, no se encontraron diferencias significativas en el SVL de los post-metamórficos de los distintos tratamientos. Por otra parte, sí se encontraron diferencias significativas en el largo de la tibio-fibula independientemente del tamaño corporal. Más aun, se encontró una relación positiva entre el largo de la tibio-fibula y el desempeño de salto, lo que indica que este rasgo se encuentra fuertemente relacionado al desempeño de salto como se ha encontrado previamente en otras especies (*Bufo Marinus*, *Bufo terrestris*, *Hyla crucifer*, *Rana clamitans*, Zug 1972; *Rana latastei*, Ficetola y De Bernardi 2006). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la desecación habría inducido tibio-fibulas más cortas, lo que a su vez habría producido una disminución en el desempeño de salto. Richter-Boix y col. (2006) encontraron que post-metamórficos de *Pelodytes punctatus* crecidos en desecación aceleraban el desarrollo y alcanzaban la metamorfosis a una menor masa corporal. Además, los post-metamórficos crecidos en desecación tenían tibio-fibulas más cortas y un menor desempeño de salto que los crecidos sin desecación. Aunque en esta tesis no se encontró una aceleración del desarrollo en las larvas de *R. spinulosa* en respuesta a la desecación, ésta afectó la morfología y el desempeño locomotor de los post-metamórficos, lo que es en parte similar a lo encontrado por Richter-Boix y col. 2006.

No determinamos directamente el efecto de la distancia de salto en la sobrevivencia de los individuos. Sin embargo, el desempeño de salto se relaciona positivamente con la capacidad de obtener alimento y/o de escape frente a depredadores (Arnold y Wassersug

1978), y con la capacidad de dispersión (Phillips y col. 2006), siendo esta última más relevante para los post-metamórficos de *R. spinulosa* dada la desecación potencial de su ambiente.

Por último, no se encontró correlación entre el desempeño de nado de las larvas y el desempeño de salto de los post-metamórficos, lo que indica la existencia de un desacople entre ambos rasgos fisiológicos. Este resultado apoya la hipótesis de desacople adaptativo (Moran 1994), y podría ser explicado por el hecho de que los rasgos o estructuras que determinan el desempeño locomotor en dichos estadios son distintos, y cuyo fenotipo no se encuentra correlacionado necesariamente. Sin embargo, se encontró que la tasa de crecimiento se correlacionó positivamente con el desempeño de salto. Por lo tanto, parte de la variación en el desempeño de salto en los post-metamórficos fue explicada por la variación en la tasa de crecimiento durante el desarrollo larval (11%). Dado que la variación en la tasa de crecimiento de los individuos puede provocar variación morfológica en el largo de las extremidades (Blouin y Loeb 1991; Blouin y Brown 2000), la relación encontrada entre la tasa de crecimiento y la distancia de salto podría ser consecuencia de un posible efecto de la tasa de crecimiento sobre el largo de la tibio-fíbula. Esto sugiere que en esta especie, la historia de crecimiento larval afecta rasgos que posteriormente podrían influir en la sobrevivencia de los individuos recién metamorfoseados, como su morfología y desempeño locomotor, a pesar de la ocurrencia de metamorfosis (Watkins 2001; Álvarez y Nicieza 2002; Ficetola y De Bernardi 2006).

Tabla 5. Resumen de las principales preguntas y resultados obtenidos en esta tesis.

Principales preguntas	Estadio del desarrollo	Principales resultados
¿Cómo afecta la desecación y la densidad larval en diferentes estadios el tiempo y tamaño a la metamorfosis, la tasa de crecimiento y la sobrevivencia a la metamorfosis?	Larva	Las larvas crecidas en densidad alta y en desecación desde el estadio Gosner 25 tuvieron un mayor tiempo a la metamorfosis, una menor tasa de crecimiento y una menor sobrevivencia a la metamorfosis con respecto a las crecidas en ausencia de estas variables. No se encontró diferencias significativas en el tamaño a la metamorfosis.
¿Que diferencias morfológicas tienen las larvas y post-metamórficos crecidos en condiciones contrastantes de desecación y la densidad larval?	Larva	Las larvas crecidas en densidad larval alta tuvieron un cuerpo y cola más anchos que las larvas crecidas en densidad larval baja.
	Post-metamórfico	En densidad larval baja, la desecación produjo una disminución del largo de la tibia-fíbula y del ancho de la cabeza. Contrariamente, en densidad larval alta la desecación no produjo una disminución de dichas variables.
¿Existe variación del desempeño locomotor en las larvas y post-metamórficos crecidos en condiciones contrastantes de desecación y densidad larval?	Larva	La densidad larval tuvo un efecto significativo sobre la velocidad de nado corregida por el largo corporal. Las larvas crecidas en densidad alta nadaron más lento que las crecidas en densidad baja.
	Post-metamórfico	La desecación tuvo un efecto significativo sobre la distancia de salto absoluta. Los post-metamórficos crecidos en desecación tuvieron una menor distancia de salto que los crecidos sin desecación.
¿El tiempo de nado de las larvas se correlaciona con la distancia de salto de los post-metamórficos?		No se encontró correlación entre la velocidad de nado de la larva y la distancia de salto del post-metamórfico. A pesar de esto, se encontró una correlación positiva y significativa entre la tasa de crecimiento y la distancia de salto del post-metamórfico.

CONCLUSIÓN

En *R. spinulosa* la historia de crecimiento experimentada durante la fase larval puede inducir variación morfológica en los individuos post-metamórficos y provocar diferencias en su desempeño locomotor.

PROYECCIONES FUTURAS

Se ha estimado que en la mayoría de los anuros, más del 90% del crecimiento de los individuos ocurre durante la fase terrestre, es decir, entre las etapas de post-metamórfico, juvenil y adulto. Por lo tanto, una interrogante a responder es si las diferencias morfológicas y en el desempeño locomotor, que pueden ser inducidas ambientalmente durante el desarrollo larval, se mantienen a través de las etapas ontogenéticas posteriores, por ejemplo a la adultez.

Trabajos anteriores han sugerido que a altas densidades larvales ocurre competencia intraespecífica entre los individuos, lo que a su vez produce la prolongación del período larval de manera similar a lo encontrado en *R. spinulosa*. Entonces, evaluar la ocurrencia de competencia intra-específica y el posible mecanismo por el cual se produciría, permitiría establecer una explicación a la respuesta fenotípica de las larvas frente a densidades altas.

REFERENCIAS

- Alford, R. A. y Harris, R. N. 1988. Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *Am. Nat.* 131:91-106.
- Álvarez, D y Nicieza, A. G. 2002. Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. *Oecologia* 131:186-195.
- Arendt, J. D. 2003. Reduced burst speed is a cost of rapid growth in anuran tadpoles: problems of autocorrelation and inferences about growth rates. *Funct. Ecol.* 17:328-334.
- Arendt, J. D. y Hoang, L. 2005. Effect of food level and rearing temperature on burst speed and muscle composition of western spadefoot toad (*Spea hammondi*). *Funct. Ecol.* 19: 982-987.
- Arendt, J. 2010. Morphological correlates of sprint swimming speed in five species of spadefoot toad tadpoles: comparison of morphometric methods. *J. Morph.* 271:1044-1052.
- Arnold, S. J. y Wassersug, R. J. 1978. Differential predation on metamorphic anurans by garter snakes (*Thamnophis*): social behavior as a possible defense. *Ecology* 59:1014-1022.
- Beck, C. W. y Congdon, J. D. 2000. Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toad, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Funct. Ecol.* 14:32-38.
- Berven, K. A. y Gill, D. E. 1983. Interpreting geographic variation in life-history traits. *Am. Zool.* 23:85-97.
- Blouin M. S. y Loeb M. L. 1991. Effects of environmentally induced development rate variation on head and limb morphology in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Am. Nat.* 138:717-728.
- 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.

- Brady L. D. y Griffiths, R. A. 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *J. Zool.* 252:61-69.
- Collins, J. P. 1979. Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ecology* 60:738-749.
- Collins, J. P. y Cheek, J. E. 1983. Effect of food and density on development of typical and cannibalistic salamander larvae in *Ambystoma tigrinum nebulosum*. *Am. Zool.* 23:77-84.
- Dayton, G. H. Saenz, D. Baum, K. A. Langerhans, R. B. y DeWitt, T. J. 2005. Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos* 111:582-591.
- Denver, R. J. 1997. Proximate Mechanisms of Phenotypic Plasticity in Amphibian Metamorphosis. *Am. Zool.* 37:172-184.
- Emerson, S. B. 1978. Allometry and jumping frogs: helping the twain to meet. *Evolution* 32:551-564.
- Emerson, S. B. 1985. Skull shape in frogs-Correlations with diet. *Herpetologica* 4: 177-188.
- Emerson, S. B. 1986. Heterochrony and frogs: the relationship of a life history trait to morphological form. *Am. Nat.* 127:167-183.
- Ficetola, G. F. y De Bernardi, F. 2006. Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latastei*. *Evol. Ecol.* 20:143-158.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190.
- Hensley, F. R. 1993. Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. *Ecology* 74:2405-2412.
- Jiménez, P. 2008. 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 de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. X+36pp.
- John-Alder, H. y Morin, P. 1990. Effects of larval density on jumping ability and stamina in newly metamorphosed *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* 3:856-860.
- Johnson, J. B. Burt, D. B. y DeWitt, T. J. 2008. Form, function, and fitness: Pathways to survival. *Evolution* 62:1243-1251.

- Klashcka, U. 2008. The infochemical effect - a new chapter in ecotoxicology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15:452-462.
- Leips, J. y Travis, J. 1994. Metamorphic responses to changing food levels in two species of hylid frogs. *Ecology* 75:1345-1356.
- Márquez-García, M., Correa-Solís, M., Sallaberry, M. y Méndez, M. A. 2009. Effects of pond drying on morphological and life history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evol. Ecol. Res.* 11:803-815.
- Márquez-García, M. Correa-Solís, M. y Méndez, M. A. 2010. Life history trait variation in tadpoles of the warty toad in response to pond drying. *J. Zool.* 281: 105-111.
- Martof, B. 1956. Growth and development of the green frog, *Rana clamitans*, under natural conditions. *Am. Mid. Nat.* 55:101-117
- McCollum, S. A. y Leimberger, J. D. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* 109: 615-621.
- Méndez, M. A. y Correa-Solís, M. 2009. Divergence in morphometric and life history trait in two thermally contrasting Andean populations of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *J. Therm. Biol.* 34:342-347.
- Merila, J. Laurila, A. Timenes Laugen, A. Rasanen, K. y Pakkala, M. 2000. Plasticity in age and size at metamorphosis in *Rana temporaria* - comparison of high and low latitude populations. *Ecography* 23:457-465.
- Moran, N. A. 1994. Adaptation and constraint in the complex life cycles of animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:573-600.
- Newman, R. A. 1988. Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution* 42:774-783.
- Newman, R. A. 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70:1775-1787.
- Newman, R. A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *BioScience* 42:671-678.
- Phillips, B. L. Brown, G. P. Webb, J. K. y Shine, R. 2006. Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature* 438:803.
- Relyea, R. A. 2002. Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues, and connections to predator-induced plasticity. *Ecological monographs* 72(4):523-540.

- Reques, R. y Tejedo, M. 1997. Reaction norms for metamorphic traits in natterjack toads to larval density and pond duration. *J. Evol. Biol.* 10: 829–851.
- Richardson, J. M. L. 2002. Burst swim speed in tadpoles inhabiting ponds with different top predators. *Evol. Ecol. Res.* 4:627-642.
- Richter-Boix, A. Llorente, G. A. y Montori, A. 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evol. Ecol. Res.* 8:309–320.
- Roff, D.A. 1992. *The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Semlitsch, R. D. Scott, D. E. y Pechmann. J. H. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69:184-192.
- Smith, D. C. 1987. Adult recruitment in chorus frogs: Effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68:344-350.
- Smith-Gill, S. J. y Berven K. A. 1979. Predicting Amphibian Metamorphosis. *Am. Nat.* 113: 563-585
- Smirnov, S. V. 1992. The influence of variation in larval period on adult cranial diversity in *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae). *J. Zool.* 226:601-612.
- StatSoft, Inc. 2001. *Statistica* (data analysis software system), version 6 (available at: www.statsoft.com).
- Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press. 248 pp.
- Tejedo, M. y Reques, R. 1994. Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: The interactive effects of density and pond duration. *Oikos* 71:295–304.
- Tejedo, M. Marangoni, F. Pertoldi, C. Richter-Boix, A. Laurila, A. Orizaola, G. Nicieza, A. Alvarez, D. y Gomez-Mestre, I. 2010. Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post-metamorphic frogs. *Clim. Res.* 43: 31-39.
- Travis, J. 1984. Anuran size at metamorphosis: Experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology* 65: 1155-1160.
- Van Buskirk, J. y McCollum, S. A. 1999. Plasticity and selection explain variation in tadpole phenotype between ponds with different predator composition. *Oikos* 85: 31-39.

- Van Buskirk, J. y McCollum, S. A. 2000. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *J. Exp. Biol.* 203:2149–2158.
- Van Buskirk, J. 2001. Specific induced responses to different predator species in anuran larvae. *J. Evol. Biol.* 14:482-489.
- 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.
- Werner, E. E. 1986. Amphibian metamorphosis: Growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *Am. Nat.* 128:319-341.
- Wilbur, H. M. y Collins, J.P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305–1314.
- Wilbur, H. M. 1977. Density-dependents aspects of growth and metamorphosis in *Bufo americanus*. *Ecology* 58:196-200.
- Wilbur, H. M. 1980. Complex life cycles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11:67-93.
- Wilbur, H. M. 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary ponds communities. *Ecology* 68(5):1437-1452.
- 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.
- Zug, G. R. 1972. Anuran locomotion: structure and function. I. Preliminary observations on relation between jumping and osteometrics of appendicular and postaxial skeleton. *Copeia* 1972 (4):613–624.