

DOC-EBE
B456
c.1

BIOLOGÍA TÉRMICA DE Bufo spinulosus:
EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO LARVAL,
UNA COMPARACIÓN INTRAESPECÍFICA

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de Doctor en Ciencias, con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

Por
Alfredo Gonzalo Benavides Luck

Octubre de 2003

Director de tesis: Prof. Alberto Veloso
Codirector de tesis: Dr. Mario Rosenmann

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por el candidato:

ALFREDO GONZALO BENAVIDES LUCK

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva.

Tutor:

Prof. Alberto Veloso

.....

Co Tutor

Dr. Mario Rosenmann

.....

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Nelson Díaz

.....

Dr. Ángel Spotorno

.....

Dr. Rigoberto Solís

.....

A Cony

A mis hijas e hijo

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis tutores, profesores Alberto Veloso y Mario Rosenmann por su apoyo y amistad, particularmente la paciencia y comprensión del profesor Veloso, que tuvo que soportar a este alumno casi virtual. También a los miembros de la comisión que reviso esta tesis, Dres. Nelson Díaz, Rigoberto Solís y Angel Spotorno, quienes contribuyeron a darle su forma final. Desarrollar una tesis sin el apoyo de un proyecto resulta una empresa a la que deben concurrir muchos amigos. El primero al que agradezco su incondicional apoyo es a mi amigo Dr. Marco Méndez, quién en mas de una oportunidad debió sacarme, a punta de acertados epítetos, de los marasmos anímicos en los que me encontraba. También agradezco la ayuda de los Dres. Manuel Contreras, Fernando Novoa, Pablo Sabat, Francisco Bozinovic, Patricio Ojeda y Juan Cancino. También agradezco la amistad y ayuda de muchos amigos de la Facultad: Eduardo Soto, Carezza Botto, Paulina Jiménez, Sergio Scott, Marcela Marques, Andrés Suazo y Carlos Pino. Con especial cariño quiero mencionar a los Papas de Eduardo Soto y su hospitalidad sin límites en Chuquicamata, y a mis amigos Alvaro y Suzanne Ascuí y su ayuda en un momento de crisis. Quiero mencionar a mis padres, quienes nunca dudaron de la realidad de esta tesis, que lamentablemente mi padre no alcanzó a ver. Agradezco a Shoona Dumond de Strathkelvin Inst. quien tuvo la gentileza de ayudar a un estudiante del fin del mundo. Finalmente quiero agradecer a mi esposa Constaza, por su apoyo y comprensión: inagotables, imprescindibles y determinantes para poder hacer realidad este sueño. El desarrollo de esta tesis fue apoyada por el Dpto. de Posgrado y Postítulo U. de Chile, Beca PG 55/99 y 23/200.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE TABLAS..... | iv |
| LISTA DE FIGURAS..... | v |
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Hipótesis..... | 11 |
| 1.2 Objetivo General | 12 |
| 2 MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 2.1 Localidades Estudiadas | 13 |
| 2.2 Caracterización de los ambientes de desarrollo y preferencia térmica de las larvas de Bufo spinulosus..... | 15 |
| 2.3 Determinación del metabolismo | 15 |
| 2.4 Efecto de la procedencia geográfica sobre el tamaño a la metamorfosis..... | 20 |
| 2.5 Efecto de la variación de la temperatura sobre el tamaño a la metamorfosis. | 22 |
| 2.6 Efecto de la temperatura y densidad sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis..... | 23 |
| 2.7 Efecto de la dieta sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis..... | 24 |
| 2.8 Efecto de la localidad sobre la respuesta a la dieta..... | 25 |
| 2.9 Calidad del agua en las cajas experimentales | 25 |
| 2.10 Efecto de dieta, temperatura y localidad sobre tasa de asimilación..... | 25 |
| 2.11 Análisis estadístico..... | 27 |
| 3 RESULTADOS..... | 28 |
| 3.1 Caracterización de los ambientes de desarrollo y preferencia térmica de las larvas de Bufo spinulosus..... | 28 |
| 3.2 Determinación del metabolismo | 35 |
| 3.3 Efecto de la procedencia geográfica sobre el tamaño a la metamorfosis..... | 38 |
| 3.4 Efecto de la variación de la temperatura sobre el tamaño a la metamorfosis. | 38 |
| 3.5 Efecto de la temperatura y densidad sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis..... | 41 |
| 3.6 Efecto de la dieta sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis..... | 42 |
| 3.7 Efecto del origen geográfico y dieta sobre el crecimiento y tamaño a la metamorfosis..... | 46 |
| 3.8 Calidad del agua de las cajas experimentales | 49 |
| 3.9 Efecto de dieta, temperatura y localidad sobre tasa de asimilación..... | 49 |
| 4 DISCUSIÓN | 54 |
| 4.1 COMENTARIO FINAL | 68 |
| 5 CONCLUSIONES..... | 74 |
| 6 LITERATURA CITADA..... | 76 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Resumen de los resultados de ANOVA dos vías para cada variable medida.... | 31 |
| Tabla 2 Temperatura (°C) entre el día y la noche entre localidades. (* = $p < 0,001$ = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)..... | 31 |
| Tabla 3 Temperatura (°C) para el invierno y verano de las localidades de El Tatio y Chita. (* = $p < 0,001$ = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)..... | 31 |
| Tabla 4 Resultados de la regresión potencial entre tasa metabólica y el peso. a y b son los coeficientes de la ecuación $MS = a * Wb$, donde MS es el Metabolismo de rutina (ml O ₂ / h) y W es el peso de la larva en g. Para cada localidad se ha calculado el Q ₁₀ | 36 |
| Tabla 5 Resumen del test de Tukey usado para comparar las tasas metabólicas corregidas a un peso de 0,1 g, obtenidas para larvas mantenidas a 15 y 25°C..... | 36 |
| Tabla 6 Número de individuos que alcanzaron la metamorfosis (n), promedio de peso en gramos que alcanzaron a la metamorfosis (Peso), crecimiento en miligramos por día (Crecimiento) y edad a la que alcanzaron la metamorfosis en días, de larvas de Chusmiza mantenidas a dos temperaturas y 4 diferentes densidades (individuos / 600 ml)..... | 43 |
| Tabla 7 Número de individuos que alcanzaron la metamorfosis (n), promedio de peso en gramos que alcanzaron a la metamorfosis (Peso), crecimiento en miligramos por día (Crecimiento) y edad a la que alcanzaron la metamorfosis en días, de larvas de Chusmiza mantenidas a una densidad de 15 ind/600ml, mantenidas a dos temperaturas y alimentados con dos dietas de diferente calidad..... | 43 |
| Tabla 8 Número de individuos que alcanzaron la metamorfosis (n), promedio de peso en gramos que alcanzaron a la metamorfosis (Peso), crecimiento en miligramos por día (Crecimiento) y edad a la que alcanzaron la metamorfosis en días, de larvas mantenidas a 25 °C a una densidad de 15 ind/600ml alimentados con dos dietas de diferente calidad (DP = Lechuga; DR = Espirulina), en larvas provenientes de dos localidades..... | 47 |
| Tabla 9 Valores de tasa de asimilación (digestibilidad aparente) para larvas de Bufo spinulosus provenientes de distintas localidades, mantenidas a dos temperaturas (15 y 25 °C) y alimentadas con una Dieta Pobre y Dieta Rica (ver texto)..... | 51 |
| Tabla 10 Resultado ANOVA para tasas de asimilación de larvas de Bufo spinulosus de diferentes localidades de origen, mantenidas a dos temperaturas (15 y 25 °C) y alimentadas con una dieta pobre y rica (ver texto)..... | 51 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Gradiente latitudinal del tamaño corporal de adultos de *Bufo spinulosus*, en que se muestra que la población que habita en EL Tatio representa una excepción (Méndez, datos no publicados). 9
- Figura 2. Mapa que muestra las localidades estudiadas 14
- Figura 3 Esquema de la metodología utilizada para explorar el efecto de la localidad geográfica y la temperatura sobre el metabolismo de larvas de *Bufo spinulosus*... 19
- Figura 4 Esquema de la metodología utilizada para explorar el efecto de la localidad geográfica y el régimen de temperatura sobre el tamaño que alcanzan en la metamorfosis larvas de *Bufo spinulosus*..... 21
- Figura 5 Temperatura en °C (columna blanca), pH (columna amarilla) en unidades de pH, Conductividad en cm/sm (columna azul) y oxígeno disuelto en mg O₂/l (columna negra) medido en las diferentes localidades durante el verano. Promedio y error estándar. 30
- Figura 6 Temperatura medida durante el día (columna vacía) y la noche (columna llena) en las localidades indicadas Promedio y error estándar..... 32
- Figura 7 Temperatura medida durante el invierno (columna vacía) y el verano (columna llena) en las localidades indicadas Promedio y error estándar. 33
- Figura 8 Temperatura medida en lugares con larvas (columna vacía) y sin larvas (columna llena) en las localidades indicadas Promedio y error estándar. 34
- Figura 9 Tasa metabólica de larvas de *Bufo spinulosus* de 0,1 g (ver texto) provenientes de diferentes localidades del norte y centro de Chile, aclimatadas a 15 °C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error representan el error estándar. 37
- Figura 10 Peso que alcanzan a la metamorfosis larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de diferentes localidades del norte y centro de Chile, en iguales condiciones de temperatura (25 °C), alimentación (lechuga hervida) y densidad (5 ind/600 ml). Las barras de error representan el error estándar. 39
- Figura 11 Peso que alcanzan a la metamorfosis larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de diferentes localidades del norte y centro de Chile, aclimatadas a un régimen constante de temperatura de 25 °C (columnas vacías) y a un régimen variable entre 15 y 25 °C (columnas llenas), en iguales condiciones de alimentación (lechuga

| | |
|---|----|
| hervida) y densidad (5 ind/600 ml). Las barras de error representan el error estándar. | 40 |
| Figura 12 Peso que alcanzan a la metamorfosis (a), Tasa de Crecimiento (b) y Edad a la metamorfosis (c) de larvas mantenidas a 4 diferentes densidades y dos temperaturas 15 °C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error representan el error estándar. | 44 |
| Figura 13 Peso que alcanzan a la metamorfosis (a), Tasa de Crecimiento (b) y Edad a la metamorfosis (c) de larvas alimentadas lechuga (columnas vacías) y espirulina (columnas llenas) mantenidas a 25 °C y densidad de 15 ind / 600 ml. Las barras de error representan el error estándar. | 45 |
| Figura 14 Peso que alcanzan a la metamorfosis (a), Tasa de Crecimiento (b) y Edad a la metamorfosis (c) de larvas alimentadas lechuga (columnas vacías) y espirulina (columnas llenas) mantenidas a 25 °C y densidad de 15 ind / 600 ml provenientes de las localidades de Farellones y Chusmiza. Las barras de error representan el error estándar. | 48 |
| Figura 15 Asimilación de Dieta Pobre (Lechuga) en larvas de Bufo spinulosus provenientes de distintas localidades y mantenidas a dos temperaturas: 15° C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error corresponden al error estándar. | 52 |
| Figura 16 Asimilación de Dieta Rica (Espirulina) en larvas de Bufo spinulosus provenientes de distintas localidades y mantenidas a dos temperaturas: 15° C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error corresponden al error estándar. | 53 |
| Figura 17 Esquema de las principales relaciones entre el ciclo de vida complejo planteado descrito para anfibios y su relación con factores bióticos y abióticos.... | 73 |

RESUMEN

Los ejemplares adultos de *Bufo spinulosus* presentan, dentro de su amplio rango de distribución, diferencias en sus patrones morfológicos, siendo un caso particular la población que habita en las aguas termales de El Tatio, donde los adultos presentan un tamaño menor. Este fenómeno natural permitió explorar los modelos planteados en la literatura en relación con el efecto de las variables ambientales sobre los atributos de la historia de vida de los anfibios, centrándose en la caracterización de los ambientes donde se verifica el desarrollo larval y la respuesta de las larvas, en relación con su crecimiento, desarrollo, tasas metabólicas y asimilación, a las variaciones de temperatura, densidad, dieta y origen geográfico. Los resultados mostraron que la principal diferencia de El Tatio radica que en este lugar no existe oscilación térmica. Las larvas de *Bufo spinulosus* se comportaron de acuerdo a lo descrito en la literatura en relación con el efecto de la densidad y dieta sobre el tamaño a la metamorfosis. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre las tasas de desarrollo resultó ser el factor más relevante. Las larvas de El Tatio alcanzaron tamaños a la metamorfosis mayores bajo un régimen de temperatura semejante a las condiciones naturales, diferencia que no pudo ser explicada por el efecto de la localidad sobre su metabolismo y su capacidad de asimilación, sino más bien, por la probable adecuación de las larvas de esta localidad a las particulares condiciones de su hábitat. El que los adultos de El Tatio sean de menor tamaño y los postmetamórficos sean más grandes, comparados con otras poblaciones, no se ajusta a los modelos planteados para los ciclos de vida de los anfibios. Es probable que este fenómeno se relacione con la vida más acuática de los adultos de esta localidad.

ABSTRACT

Adult *Bufo spinulosus* specimens present in their wide range of distribution, differences in morphological patterns. A particular case is seen in the population inhabiting the thermal waters of El Tatio, where adult individuals present a comparatively smaller size. This natural phenomenon allowed us to explore models proposed in the literature, in relation to the effects of ambiental variables on the characteristics of the amphibian life history, centering our interest on the peculiarities of the environments where the larval development occurs, and on the tadpole's response in relation to their growth, development, metabolic rates and assimilation, to variations of temperature, density, diet, and geographic origin. Results showed that the main difference found in El Tatio was the lack of thermal oscillations in this place. *Bufo spinulosus* tadpoles behaved according to the described in the literature in relation to the effects of density and diet on the metamorphic size. Nevertheless, the temperature effect on the development rates was the most relevant finding. El Tatio tadpoles reach larger metamorphic sizes under a temperature regime similar to the prevailing natural conditions. These results were not explained by the geographic effects on the metabolic rate and assimilation capability, but mostly on the probable tadpoles adaptation to the particular conditions of their habitat. The fact that El Tatio adults are of smaller size than those of other localities, while the postmetamorphic were comparatively larger, does not adjust to models describing life cycles in amphibian species. It is probable that this phenomenon may be related to the largely aquatic life of the adults in this locality

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más relevantes de la historia de vida de las especies es su tamaño corporal, debido a su reconocido efecto sobre variables como el metabolismo, relaciones depredador-presa, fecundidad y numerosos otros aspectos fisiológicos y ecológicos. A pesar de su importancia en la historia de vida de un organismo y ser uno de los atributos más comúnmente medidos de las especies, los factores que lo influyen, a escala evolutiva y ontogenética, permanecen pobremente entendidos (Peters 1983, Van Voorhies 1996).

El tamaño corporal puede ser directamente seleccionado como un carácter adaptativo por una variedad de factores ambientales, incluidos, entre otros, temperatura, humedad, hábitat, disponibilidad de alimento, competencia y enfermedades. Su importancia relativa debe ser evaluada en cada caso debido a que ninguno de ellos es universal (Nevo 1973).

Los ectotermos son organismos que en sus comienzos fueron considerados totalmente dependientes de la temperatura ambiental. Como tales, sus funciones corporales debían seguir el patrón impuesto por la temperatura ambiente. El avance de las investigaciones mostraron que esta primera apreciación era bastante incompleta, pues a pesar de que efectivamente no pueden generar suficiente calor para mantener una temperatura corporal estable, este tipo de organismos se las arregla para mantener relativamente constante su temperatura corporal por ciertos períodos de tiempo y, además, subsistir en los ambientes que a priori debieran considerarse como altamente inadecuados para ellos (Schmidt-Nielsen 1997). En la actualidad, se conoce que los

anfibios están presentes en un amplio espectro de ambientes térmicos, algunos de los cuales son extremadamente exigentes para los ectotermos. Un ejemplo típico lo constituyen los anfibios que habitan en ambientes de altitud, grupo que por si solo ha constituido una interesante fuente de investigaciones con respecto a su desarrollo y biología térmica (Navas 1996, Navas 1997).

Para los ectotermos, la temperatura ambiental ha sido identificada como uno de los factores más relevantes sobre la etapa del desarrollo huevo-larva, ya que en la medida que esta aumenta, la larva que resulta es de tamaño menor. Aun cuando este no es un fenómeno común a todos los ectotermos (excepción son los insectos), si lo sería para todos los anfibios estudiados (Rev. en Atkinson 1994, 1996). A su vez, éste efecto de la temperatura en el desarrollo larval podría tener directa influencia sobre las características de los adultos, como lo es el tamaño corporal (Wilbur & Collins 1973, rev. en Bernardo & Reagan-Wallin 2002). Por ejemplo, Berven (1990) siguió una población de *Rana sylvatica* durante siete años y observó que el número de huevos depositados y el tamaño corporal de los adultos estaba positivamente asociado con el tamaño a la metamorfosis. Por otra parte, Semlitsch et al. (1988) mostraron que para una población de salamandras habría un efecto directo entre el ambiente y el tamaño corporal, fecundidad, edad a la primera reproducción de los adultos. Debido a esto, es que se ha postulado que los factores que afectan el desarrollo larval pueden llegar a determinar algunas características relevantes de los adultos, como lo es su tamaño corporal y sus consecuencias en los parámetros de la historia de vida (Duellman y Trueb 1994, Wolf et al. 1998). De esta forma, los procesos que ocurren durante el desarrollo larval han sido reconocidos como relevantes en la historia de vida de los individuos de una población, ya que además del

mencionado efecto de la temperatura sobre el tamaño, es durante esta etapa cuando la mortalidad y la selección a menudo son mayores (Rossiter 1996). Por lo tanto, el estudio de la etapa del desarrollo de los anfibios puede resultar determinante para comprender las historias de vida de las diferentes especies, o poblaciones de una especie enfrentadas a distintos ambientes, entregando luces de las estrategias particulares de adaptación en cada localidad.

Dentro del desarrollo ontogenético, la primera etapa lo constituyen los huevos, resultado del proceso de fecundación, conformando el inicio de una nueva generación. En sí mismos conforman un organismo que necesita inicialmente fundamentalmente de oxígeno para su desarrollo (Schmidt-Nielsen 1997). Su velocidad de crecimiento, y posteriormente la de las larvas, tiene directa relación con los factores abióticos, siendo la temperatura uno de los más relevantes. Los huevos de las especies de anuros que son depositados en charcos de agua, como por ejemplo los de *Bufo spinulosus* (Cei 1962), son de hecho organismos ectotermos acuáticos. Es decir, la temperatura a la que se llevará a cabo el desarrollo, dependerá esencialmente de la temperatura del agua que los contiene y sus variaciones los afectarán directamente. En este contexto, los fenómenos de adecuación de las larvas a las variaciones en la temperatura pueden ser un factor relevante para entender las distintas características finalmente observadas en los juveniles y posteriormente en los adultos.

Explicaciones Generales Propuestas al efecto de la temperatura sobre el tamaño corporal de los ectotermos.

Las explicaciones más relevantes, postuladas en la literatura, para explicar el efecto de la temperatura sobre el tamaño corporal que alcanzan los juveniles y adultos de los ectotermos (Atkinson 1996) son:

- a) "Explicación de Von Bertalanffy": el catabolismo aumenta mas que el anabolismo con el aumento de la temperatura, dando por resultado que el tamaño que los ejemplares pueden alcanzar es menor. Esta explicación puede tener una interpretación contraria (Atkinson 1994), por lo que actualmente no es considerada relevante.
- b) Restricciones en el crecimiento tardío: debido a que las restricciones señaladas por Von Bertalanffy sólo se harían efectivas en los estados finales de desarrollo de formas juveniles y adultas; es decir, el incremento en el tamaño corporal asociado a un incremento en la temperatura, permitiría evidenciar limitaciones fisiológicas que afectarían al crecimiento, por ejemplo la disponibilidad de alimento.
- c) Agotamiento de recursos, explicación que sólo sería valida para organismos sedentarios o en ambientes muy particulares, como las larvas de anfibios que viven en pozas efimeras.
- d) Niveles críticos de recursos: ciertos recursos podrían llegar a ser limitantes en el desarrollo si en conjunto con el aumento de tamaño, el aumento de la temperatura influye en transformar alguno en limitante del crecimiento. Por ejemplo, el oxígeno puede llegar a ser un recurso limitante al aumentar el tamaño corporal y la temperatura, al aumentar los requerimientos totales de oxígeno y disminuir su disponibilidad. Lo mismo puede ocurrir con la concentración de alimento.

- e) Efecto de la temperatura sobre el tamaño celular, resultado de restricciones impuestas por la mayor temperatura al crecimiento y división de las células, por lo que el efecto sobre el tamaño del organismo completo es solamente una respuesta correlacionada.
- f) Mortalidad de los juveniles. Atkinson (1995, 1996), Sibly & Atkinson (1994) han descrito que largos períodos de crecimiento incrementan el tamaño del organismo a la edad de la primera reproducción. Por el contrario, una alta mortalidad resultante de las condiciones que experimentan los juveniles favorecerían el paso temprano a la adultez, a expensas del tamaño a la edad de la primera reproducción. Los factores que pueden asociarse a un incremento en la mortalidad, asociados a la temperatura, son:
- Incremento de riesgo de predación (o parasitismo) por parte de otros ectotermos debido al que el aumento de la temperatura conlleva un aumento en los requerimientos energéticos de los predadores y por ende de su tasa de alimentación.
 - Incremento del daño tisular asociado a una alta tasa metabólica consecuencia del aumento de la temperatura.
 - Incremento del riesgo de deshidratación o sequía (especies terrestres) como consecuencia del aumento de la evaporación consecuencia del aumento de la temperatura.
 - Limitación del oxígeno disponible (especies acuáticas), debido a que la cantidad de oxígeno disuelto disminuye con la temperatura, pudiendo llegar a ser un factor limitante del crecimiento.

- Incremento del riesgo de pérdida de hábitats en las especies acuáticas, lo que favorecería un desarrollo más rápido, con tamaños menores a la metamorfosis menores.
- g) Restricciones en la duración temporal del desarrollo impuestas por condiciones ambientales al final de la temporada que obligan a acelerar el desarrollo, a expensas del tamaño alcanzado en la maduración.

Tamaño corporal en anfibios.

Los anfibios, como muchos organismos con ciclos de vida complejos, presentan plasticidad en el tiempo que demoran en alcanzar la metamorfosis y en el tamaño que alcanzan en ella (Wilburg 1980). La variación en la edad y el tamaño a la metamorfosis, puede estar asociado a diferencias en la sobrevivencia, habilidad para dispersarse, edad y tamaño a la primera reproducción y esfuerzo reproductivo, efectos que han sido descritos para anuros (ver revisión en Twombly 1996). Debido a la importancia que adquiere el entender los mecanismos que están involucrados en el control del tiempo requerido y el tamaño alcanzado en la metamorfosis, es que se han desarrollado varios modelos para explicar su relación con el crecimiento y desarrollo (ej. Wilburg & Collins 1973, Leips & Travis 1994). De esta forma se han caracterizado un conjunto de factores, tanto bióticos como abióticos, que puedan afectarlos. De estos, los más relevantes son: la variabilidad genética, la temperatura, la densidad de las larvas, la disponibilidad de alimento, la calidad del mismo, la presencia de depredadores, la competencia y la disponibilidad de agua, entre otros (ej. Travis & Trexler 1986, Kupferberg 1997, Denver 1997, Beck 1997, Newman 1998, Loman 2002).

Efecto de la temperatura en *Bufo spinulosus*

Bufo spinulosus WIEGMANN 1835 presenta una amplia distribución geográfica, extendiéndose desde el altiplano Perú-Boliviano hasta la región Central de Chile. Esta especie habita desde el nivel del mar (zona de Arica) hasta regiones altiplánicas y andinas (Ceí 1962, Veloso y Navarro 1988). Su tolerancia fisiológica al estrés hídrico, térmico e hipoxia, y su capacidad de termoregulación conductual le permiten alcanzar hasta los 4600 msnm. (Veloso et al. 1982, Ruiz et al. 1987, Ruiz et al. 1989, Sinsch 1989). Asociado a este amplio rango de distribución, esta especie presenta notables diferencias morfométricas, tanto si se consideran gradientes altitudinales como latitudinales (Veloso et al. 1982, Ruiz et al. 1989, Soto 2003).

Entre los distintos ambientes en que habita esta especie, la localidad de El Tatio (4.320 msnm) es única por verificarse el desarrollo larval enteramente en aguas termales, cuya temperatura puede alcanzar los 30°C. Los individuos de esta población presentan una piel más suave y sin formaciones queratinosas, una coloración más oscura, una reducción del tamaño de las parótidas (Ceí 1962) y un menor tamaño corporal, si se la compara con poblaciones que habitan a menor altura y temperatura más baja, (Nuñez et al. 1982) o incluso con la población de Parinacota que habita a una altura similar (4.450 msnm) y presenta temperaturas promedio en el agua de 15 °C. Méndez (datos no publicados) muestra que existe un gradiente latitudinal en el tamaño corporal (medido como longitud antero-posterior), dentro del cual la población de El Tatio representa claramente una excepción (Figura 1). El tamaño alcanzado por esta especie en la localidad de Parinacota, a una altura similar a la de El Tatio, permite descartarla como

factor relevante en la explicación de las diferencias en el tamaño corporal. Por otra parte existe la posibilidad de que las diferencias en los tamaños corporales observados sea producto de que estaríamos en presencia de poblaciones genéticamente diferentes. Sin embargo, en la actualidad se conoce que no existe aislamiento reproductivo entre las poblaciones de Bufo de El Tatio en relación con sus vecinos más cercanos (Soto 2003). Se puede concluir que las explicaciones más factibles para las diferencias de tamaños observadas, se relacionan con el efecto de la temperatura del agua sobre los animales que habitan en El Tatio, en comparación con las otras localidades y/o diferencias latitudinales entre localidades.

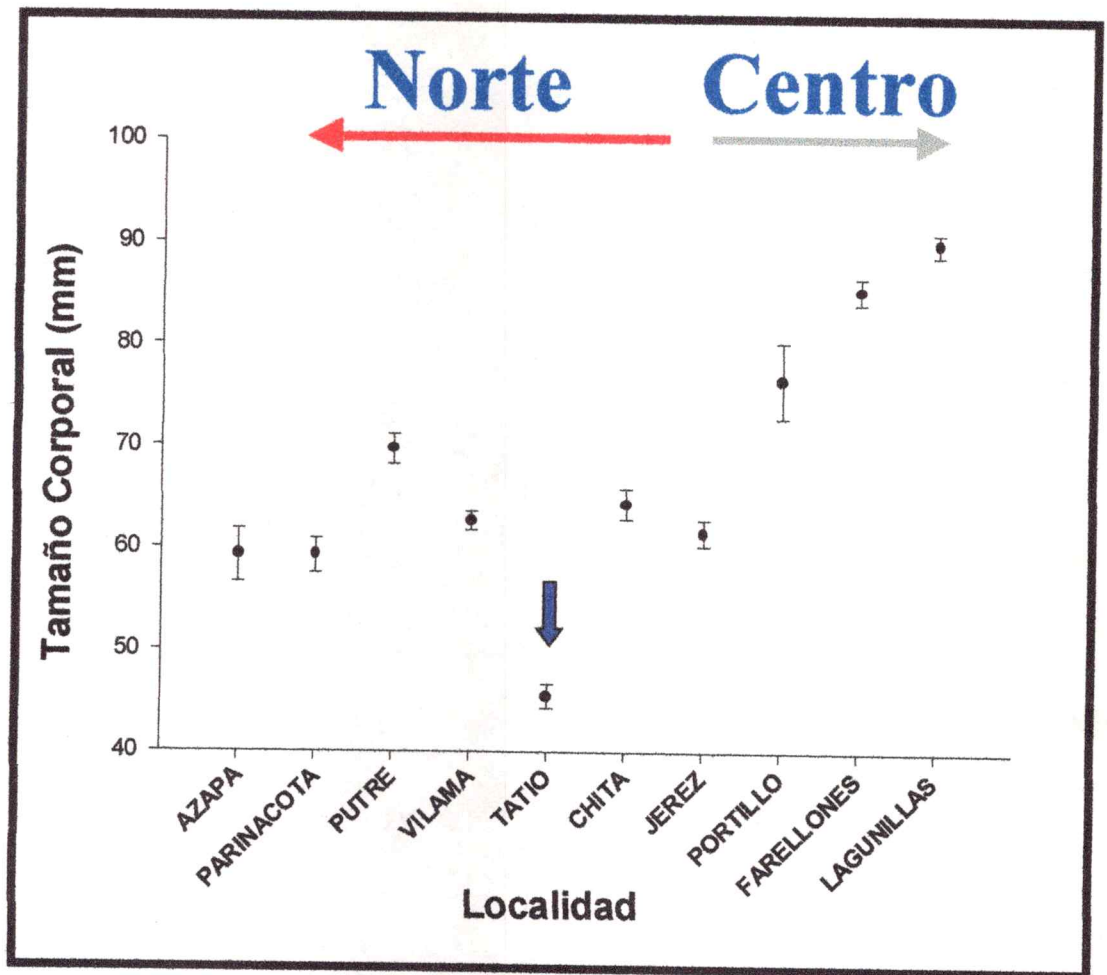


Figura 1 Gradiente latitudinal del tamaño corporal de adultos de *Bufo spinulosus*, en que se muestra que la población que habita en EL TATIO representa una excepción (Méndez, datos no publicados).

Por lo tanto, estamos en presencia de un fenómeno conocido, la disminución del tamaño corporal asociada al incremento de la temperatura. Podemos entonces revisar los mecanismos que se han señalado como los más plausibles para explicarlo.

En relación con la hipótesis de la reducción del crecimiento debido a la restricción en los recursos, se ha descrito que las poblaciones adultas que habitan a mayores altitudes presentarían dietas más herbívoras (Nuñez et al. 1982, Valencia et al. 1982). Esto permite suponer que existe probablemente una restricción en la ingesta de proteínas, lo que redundaría en una menor tasa de crecimiento. Este fenómeno ha sido descrito para los herbívoros acuáticos (Mattson 1980) como lo serían las larvas de Bufo. Este efecto se vería potenciado debido al incremento que tendría sobre el metabolismo la mayor temperatura a la que están sometidos la población de El Tatio. Por lo tanto, uno de los factores que necesariamente debe ser estudiado es la calidad de la dieta y su asimilación por parte de los organismos consumidores a un mismo estado de desarrollo y a diferentes temperaturas.

En relación con el incremento del daño tisular y la limitación en la disponibilidad de oxígeno, es conocido que el oxígeno disuelto disminuye con la altura y con el aumento de sales disueltas, ambas características presentes en el caso de El Tatio. Una forma de explorar experimentalmente estos mecanismos es estudiar el metabolismo de las larvas. Se deberá determinar si el metabolismo de las larvas se ve permanentemente afectado por el aumento de la temperatura presente en El Tatio, fenómeno conocido como compensación parcial o no compensación al cambio de la temperatura (Precht 1958, citado en Davenport 1992). Por otra parte, estudiando la presión crítica de oxígeno de las

poblaciones en estudio, en conjunto con el conocimiento de la disponibilidad real de oxígeno disuelto para ellas, podremos determinar si el oxígeno es limitante.

Las restricciones en el tiempo disponible no aparecen relevantes para el caso de El Tatio, debido a que estas aguas termales estarían a una temperatura constante todo el año, hecho que deberá ser confirmado para descartar definitivamente este mecanismo.

Cualesquiera que sea el mecanismo que este actuando en el caso de los Bufo de El Tatio, su accionar darían por resultado individuos metamorfoseados de menor tamaño, lo que debería tener a su vez como consecuencia, ejemplares adultos más pequeños (Berven 1990, Semlitsch et al.1988).

1.1 Hipótesis

Sobre la base de los antecedentes enumerados anteriormente, se plantearon las siguientes hipótesis para la presente tesis:

Hip. 1: En poblaciones de Bufo spinulosus que habitan a una altura similar, pero en distintas latitudes y condiciones, las diferencias en el tamaño corporal de los individuos metamorfoseados y adultos son el resultado de diferencias en la temperatura de desarrollo embrionario y larvario.

Hip. 2: Estas diferencias en el desarrollo estarían mediadas por diferencias en las tasas metabólicas a largo plazo y a balances energéticos en etapas premetamórficas.

1.2 Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis fue caracterizar del desarrollo larval de distintas poblaciones *Bufo spinulosus* y los ambientes en que se verifica su desarrollo larval a lo largo de su rango de distribución. Esta caracterización necesariamente debe incluir la respuesta de las larvas a las variaciones de las condiciones ambientales, particularmente temperatura del agua y dieta.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localidades Estudiadas

Las localidades estudiadas se pueden observar gráficamente en la Figura 2 y corresponden a:

- 1) Zapahuira, un arroyo cordillerano ubicado a 3281 msnm en la I región ($18^{\circ} 31' 14.4''$ S; $70^{\circ} 10' 29.6''$ W)
- 2) Chusmiza una quebrada con agua corriente ubicada a 3213 msnm en la I región ($19^{\circ} 40' 45.2''$ S; $69^{\circ} 10' 52.6''$ W),
- 3) El Tatio, ubicado a 4.264 msnm en II Región ($22^{\circ} 20' 22.8''$ S $68^{\circ} 01' 06.3''$ W), corresponde a un estero de aguas termales.
- 4) Quebrada Chita, ubicado a 3.741 msnm en la II Región ($22^{\circ} 25' 04.3''$ S $68^{\circ} 10' 28.3''$ W), corresponde a una poza permanente alimentada por escurrimientos superficiales de agua.
- 5) Río Vilama, ubicado a 2.579 msnm en la II región ($22^{\circ} 52' 01.4''$ S $68^{\circ} 10' 56.6''$ W), corresponde a pozas al borde de la corriente del nacimiento del río.
- 6) Caspana, ubicado a 3.245 msnm en la II región, corresponde a un estero que discurre por el fondo de una quebrada.
- 7) Farellones, ubicado a 2.331 msnm, en la zona central ($33^{\circ} 21' 00.2''$ S $70^{\circ} 18' 59.4''$ W), corresponde a un arroyo cordillerano que discurre por una planicie de exposición poniente.

No todas estas localidades fueron utilizadas para todos los experimentos y determinaciones por razones logísticas, por tanto para cada experimento o determinación se detallan las poblaciones utilizadas.



Figura 2. Mapa que muestra las localidades estudiadas

2.2 Caracterización de los ambientes de desarrollo y preferencia térmica de las larvas de *Bufo spinulosus*.

Durante los años 2001 y 2002 las localidades El Tatio, Chita, Vilama y Farellones fueron visitadas durante primavera y verano. En estas visitas se determinó la temperatura del agua alrededor de medio día, con una precisión de 0,1 °C, el pH, la concentración de oxígeno disuelto y la conductividad utilizando un equipo WTW multisensor, en lugares fijos que fueron visitados en cada oportunidad. Para las localidades de El Tatio y Chita se determinó la temperatura durante el invierno. En las visitas efectuadas durante el año 2002 a las localidades de El Tatio, Quebrada Chita, Farellones y Caspana, se procedió a determinar la temperatura durante el día (alrededor de las 12:00 hrs.) y la noche (como mínimo 3 horas luego de la puesta de sol). Finalmente, para estas mismas cuatro localidades, se procedió a medir la temperatura en un mismo sector, en los lugares donde había presencia de larvas (generalmente los bordes de los cursos de agua o pozas) y en los lugares cercanos donde no había larvas (generalmente a no más de 20 cm del punto inicial). Para comparar los resultados solo se utilizaron aquellos datos que fueron medidos en estaciones equivalentes.

2.3 Determinación del metabolismo

Las larvas recolectadas en las localidades de Zapahuira, Tatio, Chita, Caspana y Farellones fueron trasladadas al laboratorio en bolsas plásticas herméticas y mantenidas en un cámara de temperatura constante (15 ± 1 °C) en cajas plásticas con un volumen de agua de 4 l y aireación constante, con una alimentación a base de lechuga hervida. Luego de una semana, muestras al azar de cada colecta fueron trasladadas a cajas plásticas con

un volumen de agua de 600 ml y con una densidad de aproximadamente 15 individuos por caja. Para cada localidad, se mantuvo una caja a la temperatura ambiente de la cámara 15 ± 1 °C y otra a 25 ± 1 °C al hacerlas flotar en un estanque en el que se mantuvo una temperatura mayor mediante el uso de un calefactor de inmersión eléctrico. La temperatura de este estanque fue regulada de tal forma de lograr que el agua contenida en las cajas que flotaban se mantuviera alrededor de los 25 °C. Luego de tres semanas, se midió la tasa metabólica de cada larva mediante un sistema de circuito cerrado, consistente en una cámara de vidrio de un volumen máximo de 1,8 ml, en la que se inserta un electrodo Strathkelvin (modelo 1302) conectado a un oxigenómetro Strathkelvin modelo 781b. Las larvas dejaron de alimentarse 24 horas antes de las mediciones, para minimizar el efecto de la Acción Dinámica Específica en las determinaciones. Luego de poner la larva se esperó un tiempo de entre 10 a 20 minutos, hasta que la larva se mantenía quieta en la cámara, o a lo menos presentara un patrón mínimo de actividad, cuando el ejemplar no se mantenía con una actividad baja, se descartó el registro. La larva se retiró de la cámara al alcanzar el porcentaje de saturación de oxígeno un valor de alrededor de 30. La variación en el tiempo del porcentaje de saturación de oxígeno presente en la cámara se graficó mediante un registrador Asea Brown Boveri Modelo SE 120. Durante las determinaciones la temperatura de la cámara metabólica se mantuvo a 15 y 25 °C con una precisión de 0,1 °C. Posteriormente, se determinó el peso húmedo de cada larva, al ponerlas brevemente sobre papel secante y luego pesarlas en una balanza precisión de 0,0001 g en la que se disponía de un pequeño recipiente con agua previamente pesado. La tasa metabólica de cada ejemplar fue

calculada sobre la base de la pendiente observada, considerando un valor de contenido de oxígeno a 100 % de saturación de 10,12 mg O₂ l⁻¹ para 15 °C y de 8,25 mg O₂ l⁻¹ para 25 °C (Green & Carritt 1967). Debido a que las larvas presentaban diferentes tamaños al inicio del experimento y luego de dos semanas de aclimatación a las dos temperaturas, se corrigió la tasa metabólica para un peso de 0,1 g usando la siguiente ecuación:

$$VO_2(0,1) = VO_2(1) * (0,1 / MC(1))^b$$

Donde VO₂(0,1) = metabolismo de una larva de 0,1 g, VO₂(1) = metabolismo de una larva de peso MC(1), y b es el exponente de la relación alométrica entre metabolismo y masa corporal (MC) para cada localidad y temperatura. Dado que durante las mediciones, las larvas presentaron un grado de actividad espontánea no evaluada, la tasa obtenida corresponde a la Metabolismo de Rutina (Rome et al.1992). Un esquema que resume la metodología utilizada se observa en la Figura 3.

Durante las determinaciones de la Tasa Metabólica, se permitió que los valores de porcentaje de saturación de oxígeno alcanzaran el 30 % del valor a 100 % de saturación, registrándose para cada caso si existió un cambio agudo en la pendiente que representa la Tasa Metabólica al disminuir el contenido de oxígeno al interior de la cámara metabólica.

Para las localidades de Zapahuira y Chusmiza, no se pudo disponer de datos de temperatura del agua. Sin embargo, se utilizó información proveniente de la Dirección General de Aguas recolectada por un período de nueve años para localidades cercanas y a

una altura similar: Río Camarones en Esquiña (3000 msnm; temperatura máxima del agua en verano (TMV): 23.5 °C, temperatura máxima en invierno (TMI): 5 °C; ubicada a aproximadamente 50 km al sur de Zapahuiria, y Río Camiña en Altura (2600 msnm; TMV: 20 ° C; TMI: 8°C) ubicada a aproximadamente 60 km al norte de Chusmiza. Sin embargo, esta información es solo referencial y nos permite solo tener una idea aproximada del probable ambiente térmico de las larvas.

Rome et al. (1992) resume las principales dificultades que han presentado los estudios de aclimatación a la temperatura efectuados en anfibios. Entre estos la actividad no controlada es uno de los más relevantes. Si bien en la presente tesis no se cuantificó la actividad de las larvas a las diferentes temperaturas, se tomaron precauciones para asegurar que sus niveles fueran comparables. La primera de ellas fue esperar un tiempo luego de su manipulación, hasta que la larva se mantenía la mayor parte del tiempo quieta. Aquellas que no presentaron este patrón, fueron descartadas ya que sus registros eran claramente distinguibles por los constantes cambios en la pendiente observada. Sólo los registros que resultaron claramente lineales y de pendiente constante fueron utilizados, los que correspondieron a las larvas de bajo nivel de actividad. La segunda, el volumen reducido de la cámara (0,8 a 1,2 ml) restringió las posibilidades de movimientos de las larvas. Otro factor que ha invalidado algunos experimentos es el aumento importante de las Tasas Metabólicas a raíz de la Acción Dinámica específica. En el presente estudio las larvas dejaron de alimentarse 24 horas antes de las mediciones, y dado que el tiempo de retención del alimento en las larvas oscila entre las 6 y las 18 horas (Benavides, obs. per.), el tiempo sin alimento utilizado reduciría significativamente la interferencia de la Acción Dinámica Específica en las determinaciones.

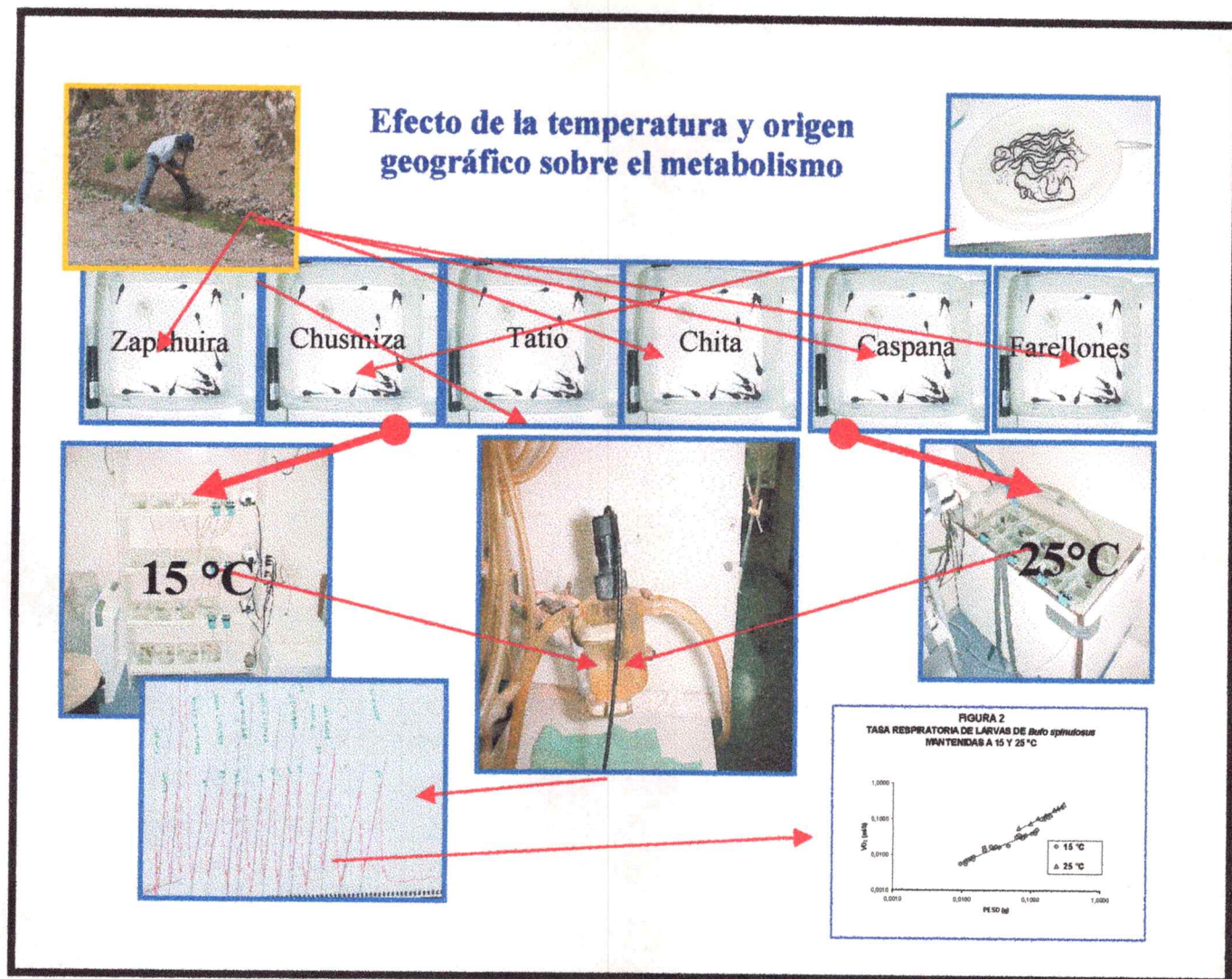


Figura 3 Esquema de la metodología utilizada para explorar el efecto de la localidad geográfica y la temperatura sobre el metabolismo de larvas de *Bufo spinulosus*.

2.4 Efecto de la procedencia geográfica sobre el tamaño a la metamorfosis

Para evaluar si existían diferencias en el tamaño a la metamorfosis entre individuos provenientes de diferentes localidades a lo largo del rango de distribución latitudinal de esta especie, se dispusieron larvas provenientes de las localidades de Chusmiza, Tatio, Chita y Farellones. Los individuos fueron dispuestos en recipientes plásticos a una densidad de 5 ind/600ml, con tres réplicas para cada localidad, alimentados con lechuga hervida y mantenidos a 25 ± 1 °C. Se escogió esta temperatura dado que se aproxima a la temperatura preferida en el verano por las larvas en las diferentes localidades estudiadas. Los valores de peso a la metamorfosis fueron obtenidos pesando los individuos que alcanzaron el estado 46 de Gosner (1960) en una balanza (precisión: 0.001 g) luego de disponerlos brevemente sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua adherida al ejemplar. No fue posible determinar la edad para los individuos de todas las poblaciones, dado que las larvas provenientes de El Tatio y Chita correspondieron a individuos recolectados en terreno. Todas las larvas al comienzo del experimento presentaban estados de desarrollo similar: 21 al 23 de Gosner (1960). Un esquema que resume la metodología utilizada se observa en la Figura 4.

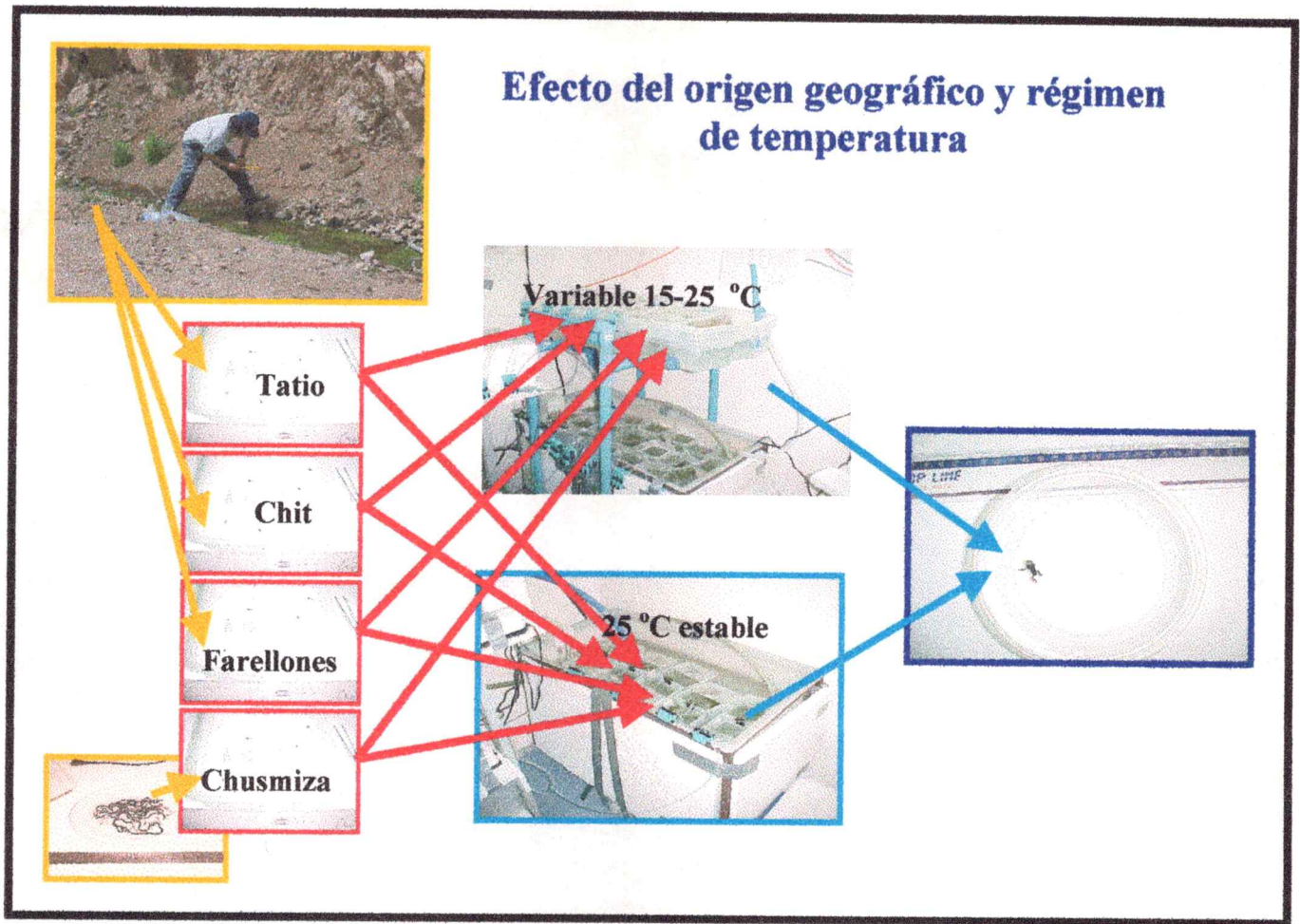


Figura 4 Esquema de la metodología utilizada para explorar el efecto de la localidad geográfica y el régimen de temperatura sobre el tamaño que alcanzan en la metamorfosis larvas de *Bufo spinulosus*.

2.5 Efecto de la variación de la temperatura sobre el tamaño a la metamorfosis.

Dado que es conocido que en los ambientes naturales en los que se desarrollan las larvas de *Bufo spinulosus*, a excepción de la localidad de El Tatio, la temperatura del agua presenta una oscilación diaria, se evaluó el efecto sobre el tamaño a la metamorfosis de dos regímenes de temperatura. a) un régimen de temperatura constante de 25 ± 1 °C, (similar a El Tatio); b) un régimen de temperatura que varió entre los 15 y 25 °C (oscilaciones descritas para las otras localidades). Para ello, un conjunto de las mismas larvas utilizadas en el experimento descrito en el párrafo anterior fueron dispuestas en iguales condiciones de alimentación y densidad, pero sometidas a un régimen de temperatura variable de entre 15 y 25 °C, disponiendo las cajas con los individuos semisumergidas en un estanque en que se hizo circular agua a 25 °C por un lapso de 11 h al día. Este estanque por estar ubicado a su vez en una cámara cuya temperatura ambiente se mantenía a 15 °C, alcanzaba la temperatura esta temperatura (15 °C) en un lapso de 3 horas una vez que la circulación de agua a 25 °C era interrumpida. De igual forma, a la mañana siguiente, al comenzar la circulación de agua caliente, el estanque alcanzaba los 25 °C en aproximadamente 1 h. De esta forma, los individuos estuvieron sujetos a un régimen de aproximadamente 10 horas al día a 25 °C, 10 horas al día a 15 °C. La oscilación térmica a la que fueron sometidas fue coordinada con el fotoperíodo, de tal forma que simulara las condiciones naturales de mayor temperatura durante las horas de luz y menor en la oscuridad.

2.6 Efecto de la temperatura y densidad sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis.

En abril de 2002 se recolectaron individuos adultos de *Bufo spinulosus* en la localidad de Chusmiza (19°40'45,2"S, 69°10'52,6"W, 3213 mns), posteriormente estos ejemplares fueron trasladados al laboratorio en Santiago. En este lugar se procedió a efectuar una reproducción artificial, inyectando las hembras con Gonadotropina Coriónica Humana para forzar la postura de los huevos. A partir de esta postura, se procedió a fecundarlos agregando macerado de testículo obtenido de un macho. Los huevos fecundados fueron mantenidos por 48 h a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron trasladados a un estanque de 5 l de capacidad con aireación constante, el que ubicado en una cámara de temperatura constante (15 ± 1 °C) con un fotoperíodo de 12L:12O. Una vez que los huevos eclosionaron y alcanzaron el estado de desarrollo 21 – 22 Gosner (1960), fueron dispuestos en cajas plásticas con 600 ml de agua deionada, con un diseño factorial para 4 densidades: 5, 15, 30 y 45; y dos temperaturas: 15 y 25°C. El tratamiento de 25°C fue logrado ubicando las cajas semi sumergidas en un estanque con un calefactor de inmersión. La temperatura de este estanque fue regulada de manera que la temperatura del agua de las cajas con larvas fuera de 25 ± 1 °C, lo fue controlado permanentemente. Para cada tratamiento se dispusieron 4 réplicas. Las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida ad libitum. El agua y el alimento fueron renovados totalmente cada 72 h. Se tuvo cuidado que en ninguna oportunidad las larvas consumieran totalmente el alimento entre los cambios de agua, en caso de ser necesario se agregó alimento entre períodos de cambio de agua. En cada renovación de agua las cajas fueron reubicadas al azar para minimizar el posible efecto su ubicación en el

régimen térmico de ellas. Cuando las larvas alcanzaron el estado de desarrollo 45 de Gosner fueron retiradas y ubicadas en pequeñas cajas con papel absorbente húmedo a fin de prevenir la desecación. Una vez que las larvas reabsorbieron totalmente la cola (Estado 46 de Gosner 1960) fueron pesadas en una balanza con precisión 0,0001 g luego de disponerlas brevemente sobre un papel absorbente, para evitar el efecto del exceso de agua adherida al ejemplar. Dado que se conoce la fecha en la cual los huevos fueron fecundados, es posible determinar el tiempo que demoran en alcanzar la metamorfosis (Edad) y calcular la tasa promedio de crecimiento diario como el peso en mg dividido por la Edad.

2.7 Efecto de la dieta sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis.

Incluir en el diseño anterior el efecto de dos dietas distintas, habría significado, para un diseño factorial completo, la necesidad de disponer de 72 tratamientos con 216 cajas (suponiendo 3 réplicas por cada tratamiento), lo que hacía extremadamente difícil su manejo y control. Además, el número de larvas requeridas (1.520) resultan poco probable de obtener a partir de una sola postura. Debido a ello, para verificar el efecto de la dieta, se utilizó la densidad 15 ind/600ml a las dos temperaturas indicadas anteriormente. Las dos dietas utilizadas consistieron en lechuga hervida, considerada una dieta pobre (DP), y otra dieta consistente en alimento para peces herbívoros elaborado sobre la base de la microalga espirulina (Wardley spirulina plus), considerada una dieta rica (DR). Para cada tratamiento de dieta y temperatura (a densidad 15 ind/600 ml) fueron dispuestas cuatro réplicas.

Para corroborar la diferencia en la calidad de las dietas usadas se determinó el contenido de energía y nitrógeno total orgánico de muestras secas de ambos alimentos, resultando mayor el contenido de energía y nitrógeno total orgánico en la DR que en la DP (3.164 versus 2.171 cal/g y 47,53 versus 22,28 µg/mg respectivamente).

2.8 Efecto de la localidad sobre la respuesta a la dieta.

Para evaluar la variabilidad en la respuesta a la dieta entre individuos provenientes de dos poblaciones distintas, se montó un experimento a densidad 15 ind/600ml y 25 °C, alimentados con DP y DR, con larvas provenientes de la localidad de Farellones, ubicada en la zona central de Chile, obtenidas a partir de fecundación natural lograda con individuos adultos recolectados en amplexo. El experimento se desarrolló de igual forma que el descrito anteriormente, a fin de obtener el peso y la edad de los individuos a la metamorfosis.

2.9 Calidad del agua en las cajas experimentales

Durante el desarrollo de los experimentos se midió el pH, contenido de oxígeno disuelto y conductividad del agua de las cajas experimentales.

2.10 Efecto de dieta, temperatura y localidad sobre tasa de asimilación.

Larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de 4 diferentes localidades, Chusmiza, Tatio, Chita y Farellones fueron mantenidas en condiciones de laboratorio a dos temperaturas 15 ± 1 y 25 ± 1 °C. Las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida ad libitum en condiciones de densidad similares (15 ind/600 ml) y fotoperíodo constante

(12L:12O). Las larvas de Chusmiza y Farellones correspondieron a un conjunto de las larvas hermanas completas. Subconjuntos tomados al azar de 15 larvas de ambas temperaturas de cultivo, en estado de desarrollo similar, Gosner 23 al 25 (1960), fueron ubicadas en recipientes con 600 ml de agua alimentadas con dos dietas artificiales: la dieta pobre (DP) correspondió a lechuga hervida y la dieta rica (DR) correspondió a alimento para peces elaborado sobre la base de la microalga espirulina (Wardley Spirulina Plus). Para cada tratamiento de dieta – localidad – temperatura se dispuso de 3 replicas. Transcurridas dos semanas, cada conjunto de larvas (replica) fue transferido a un recipiente limpio con agua fresca sin alimento, en el que durante las siguientes una a dos horas se recolectó mediante una pipeta pasteur las fecas producidas por el conjunto de larvas, las que luego fueron centrifugadas a 2.500 rpm por 10 m. Las fecas decantadas fueron transferidas a recipientes de papel aluminio, los que previamente fueron quemados en una mufla a 550 °C por 4 horas y pesados con precisión 0,0001 g, para posteriormente ser secadas a peso constante en una estufa a 55 °C por 48 h. Posteriormente cada recipiente de aluminio fue pesado para determinar la cantidad de materia seca presente y quemados a 550 °C por 6 horas, luego de lo cual fueron nuevamente pesados para determinar a cantidad de ceniza presente en cada muestra, de tal forma de calcular el porcentaje de ceniza de cada muestra. El mismo procedimiento de secado y quemado fue seguido con muestras de la DR y DP para determinar su porcentaje de ceniza. Además, para los alimentos se determinó el contenido de energía quemando muestras secas en una bomba calorimétrica PARR 1261 y la cantidad de nitrógeno total mediante el método de Kjeldahl modificado por Muhlhauser & Soto

(1987). La cantidad de energía fue expresada en KJ por peso seco libre de ceniza (PSLC) al corregir los valores de energía obtenidos por la cantidad de ceniza. El nitrógeno total fue expresado como $\mu\text{g}/\text{mg}$.

La eficiencia de asimilación (EA), también llamada digestibilidad aparente, fue calculada mediante la siguiente ecuación (Montgomery & Gerking 1980):

$$EA = (\% \text{ ceniza dieta} - \% \text{ ceniza fecas}) * \% \text{ ceniza dieta} * 100.$$

Los valores para cada tratamiento fueron promediados y expresados como porcentaje de eficiencia de asimilación y su error estándar.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un ANOVA de tres vías. Los valores de eficiencia de asimilación fueron transformados a Arcoseno [$\sqrt{(\% / 100)}$] para satisfacer el requerimiento de normalidad de los datos. La homogeneidad de las varianzas fue probada mediante de test de Cochran ($p > 0.2$).

2.11 Análisis estadístico

Los efectos de cada variable independiente sobre las variables medidas fueron determinados mediante test de ANOVA, seguido de un test a posteriori de Tukey. Cuando fue necesario los resultados fueron transformados a logaritmo a fin de cumplir con el supuesto de normalidad de los datos. La homogeneidad de las varianzas fue probada mediante de test de Cochran ($p > 0.2$ para todos los casos). En todos los análisis conducidos para los experimentos de crecimiento, fue incorporado como factor independiente Caja (replica), sin embargo, en todos resultó no significativo ($p > 0,3$), lo que comprobó que la aleatorización en la ubicación de las cajas al interior de la cámara

y/o estanques fue eficiente en minimizar el error experimental asociado a diferencias en las temperaturas de cada caja.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterización de los ambientes de desarrollo y preferencia térmica de las larvas de *Bufo spinulosus*.

La temperatura, pH, conductividad y contenido de O₂ son diferentes en cada localidad, sin embargo no hay diferencias entre primavera y verano (Figura 5). Un ANOVA de dos vías mostró que no hay diferencias entre primavera y verano, la que si existió entre las localidades (Tabla 1). En cuanto a las temperaturas, el test de Tukey indicó que El Tatio y Chita no resultan distintos, lo mismo que Vilama y Farellones. Si bien, no fueron incorporadas a los análisis efectuados, las localidades cercanas de Río Camarones (similar a Zapahuira) y Río Camiña (similar a Chusmiza) éstas presentan regímenes térmicos similares a los descritos para el resto de las localidades, con temperaturas durante el verano que alcanzan los 23,5 °C y 5 °C en invierno. En cuanto al pH y Conductividad, solo resultan comparables Vilama y Farellones. En cuanto a la disponibilidad de oxígeno, solo Chita resulta ser diferente de las demás localidades.

Para todas las localidades estudiadas, a excepción de El Tatio, existe una oscilación térmica importante entre el día y la noche (Figura 6). Un ANOVA de dos vías (Localidad y Hora: día o noche) para la temperatura del agua, muestra que la localidad ($F_{(3,30)} = 95.22$, $p < 0.01$) y la Hora ($F_{(1,30)} = 777.04$, $p < 0.01$) tienen efecto sobre la

temperatura. La comparación a posteriori mediante un test de Tukey muestra que sólo en el caso de El Tatio no hubo diferencia entre el día y la noche (Tabla 2).

En la localidad de El Tatio no existió diferencia entre las temperaturas medidas en invierno y verano, la que resultó claramente distinta para la localidad de Chita (

Figura 7). Un ANOVA de dos vías para época y localidad mostraron que ambas tienen efecto sobre la temperatura ($F_{(1,14)}= 121.29$, $p < 0.001$ y $F_{(1,14)}= 811.12$, $p < 0.001$ respectivamente). La comparación a posteriori mediante un test de Tukey muestra que para El Tatio no hay diferencia entre las temperaturas de invierno y verano y si para Chita (Tabla 3).

Las larvas de Chita y Farellones prefieren claramente los ambientes con mayor temperatura disponible, a excepción de El Tatio donde la tendencia es inversa (Figura 8). Dado que las observaciones de preferencias de temperaturas de las larvas no son independientes entre sí, en términos estadísticos, el efectuar una correlación con métodos tradicionales, no garantizaba el cumplir con los supuestos de independencia entre las observaciones. Por esta razón, se recurrió a una técnica de aleatorización utilizando el programa Resampling2 (bajado desde www.uvm.edu/~dhowell/StatPages/Resampling/ResamplingPackage.zip). Brevemente se aleatorizó 100.000 veces las observaciones de presencia de larvas y temperatura. Este método mostró que existe una correlación significativa entre ambas variables ($r=-0.4761$ $p < 0.0001$).

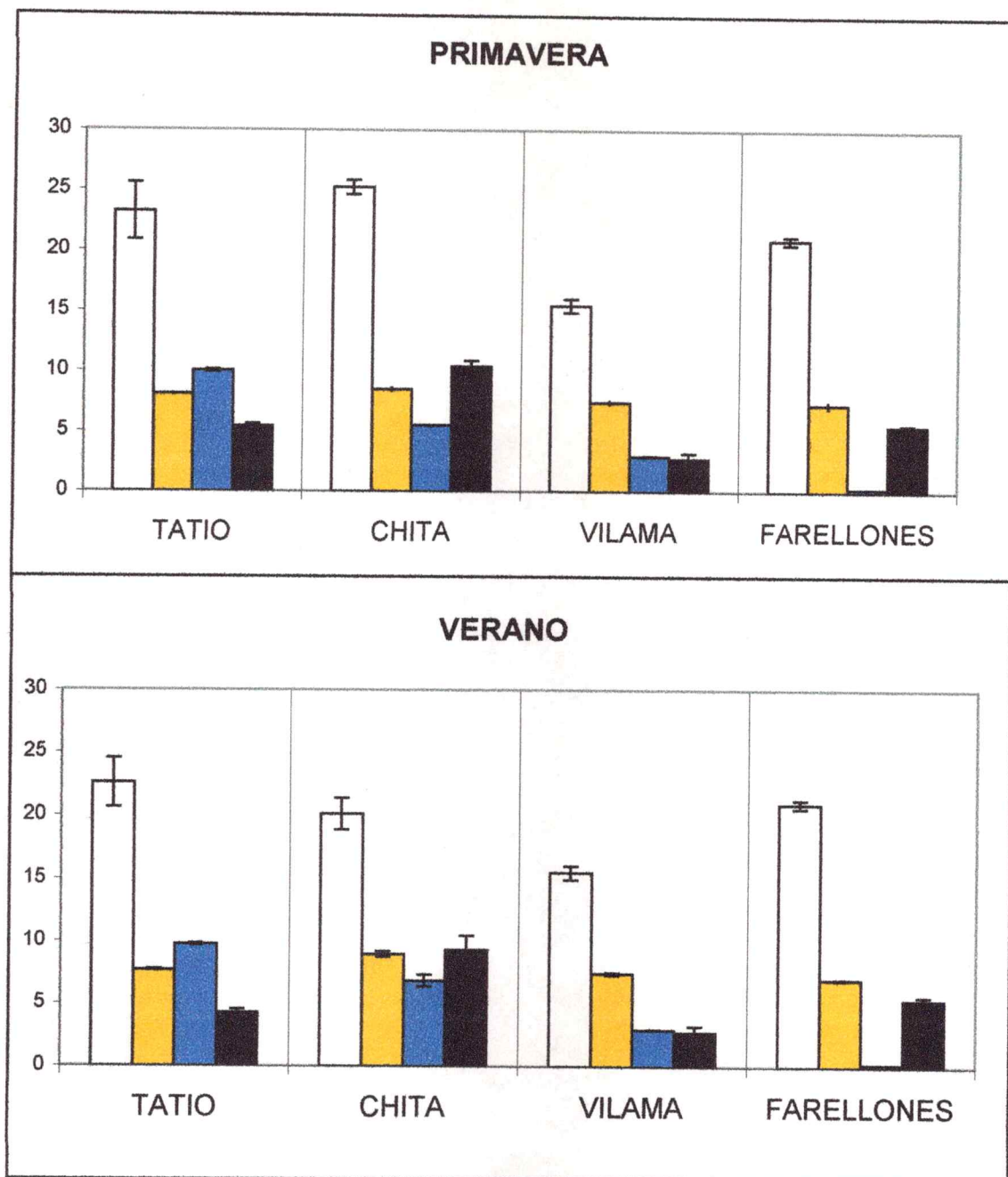


Figura 5 Temperatura en °C (columna blanca), pH (columna amarilla) en unidades de pH, Conductividad en cm/sm (columna azul) y oxígeno disuelto en mg O₂/l (columna negra) medido en las diferentes localidades durante el verano. Promedio y error estándar.

Tabla 1 Resumen de los resultados de ANOVA dos vías para cada variable medida. (* = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

| | Temperatura | pH | Conductividad | Oxígeno |
|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Época | gl 1,18 F= 2,26 | gl 1,18 F= 1,2 | gl 1,18 F= 1,15 | gl 1,18 F= 1,69 |
| Localidad | gl 3,18 F= 9,50 *** | gl 3,18 F= 50,51*** | gl 3,18 F= 1231,41*** | gl 3,18 F= 31,66*** |
| Época x Localidad | gl 3,18 F= 9,97*** | gl 3,18 F= 3,07 | gl 3,18 F= 406,42 *** | gl 3,18 F= 11,79*** |

Tabla 2 Temperatura (°C) entre el día y la noche entre localidades.

(* = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

| Localidad | Día | | Noche | | |
|------------|-------|-------------|-------|--------|-----|
| | | | | | |
| Tatio | 25,71 | ± 1,20 - | 22,60 | ± 1,96 | - |
| Chita | 26,46 | ± 0,51 n.s. | 8,46 | ± 0,31 | *** |
| Caspana | 21,10 | ± 0,31 n.s. | 9,33 | ± 0,12 | *** |
| Farellones | 23,80 | ± 0,66 n.s. | 5,47 | ± 0,23 | *** |

Tabla 3 Temperatura (°C) para el invierno y verano de las localidades de El Tatio y Chita. (* = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

| Localidad | Invierno | | Verano | | |
|-----------|----------|--------|--------|--------|------|
| Tatio | 25,60 | ± 1,40 | 22,60 | ± 1,96 | n.s. |
| Chita | 1,48 | ± 0,41 | 20,12 | ± 1,26 | *** |

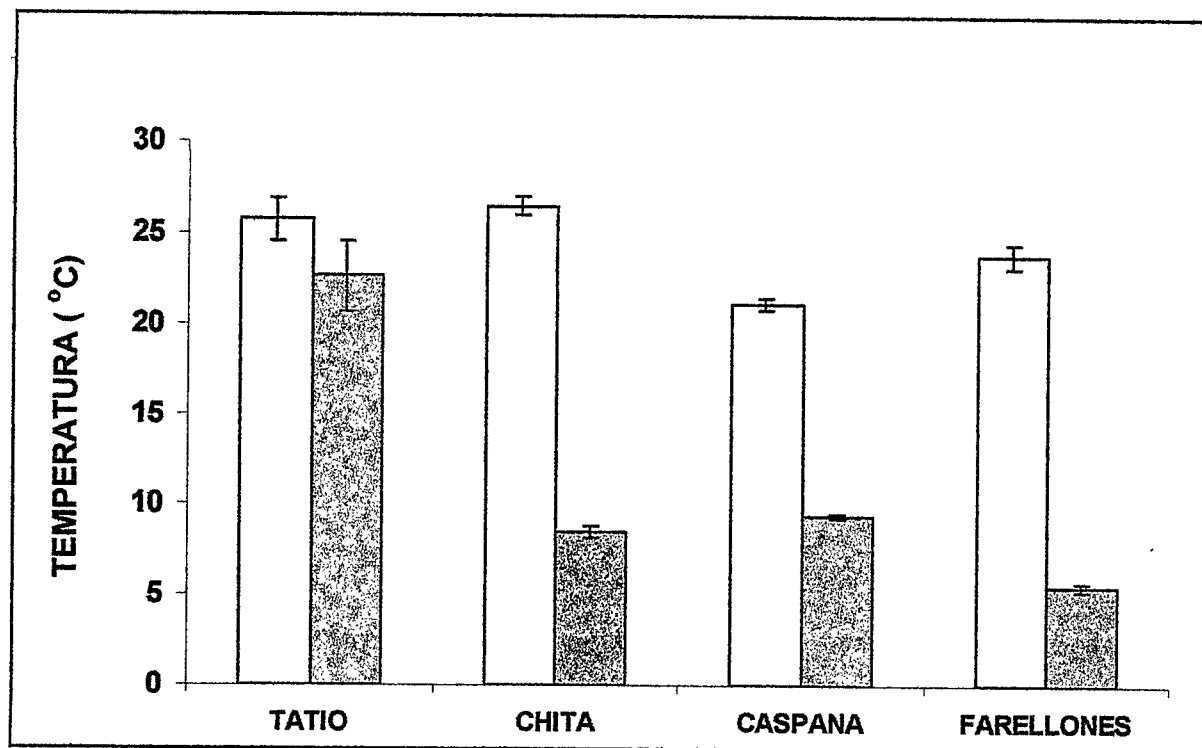


Figura 6 Temperatura medida durante el día (columna vacía) y la noche (columna llena) en las localidades indicadas Promedio y error estándar.

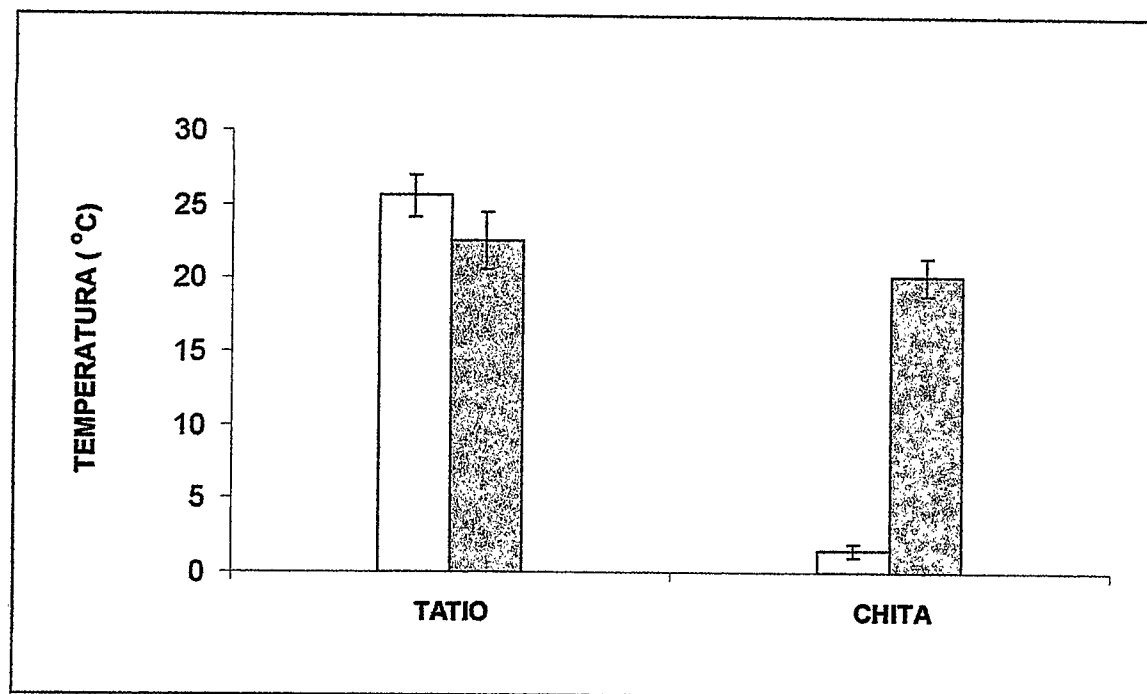


Figura 7 Temperatura medida durante el invierno (columna vacía) y el verano (columna llena) en las localidades indicadas Promedio y error estándar.

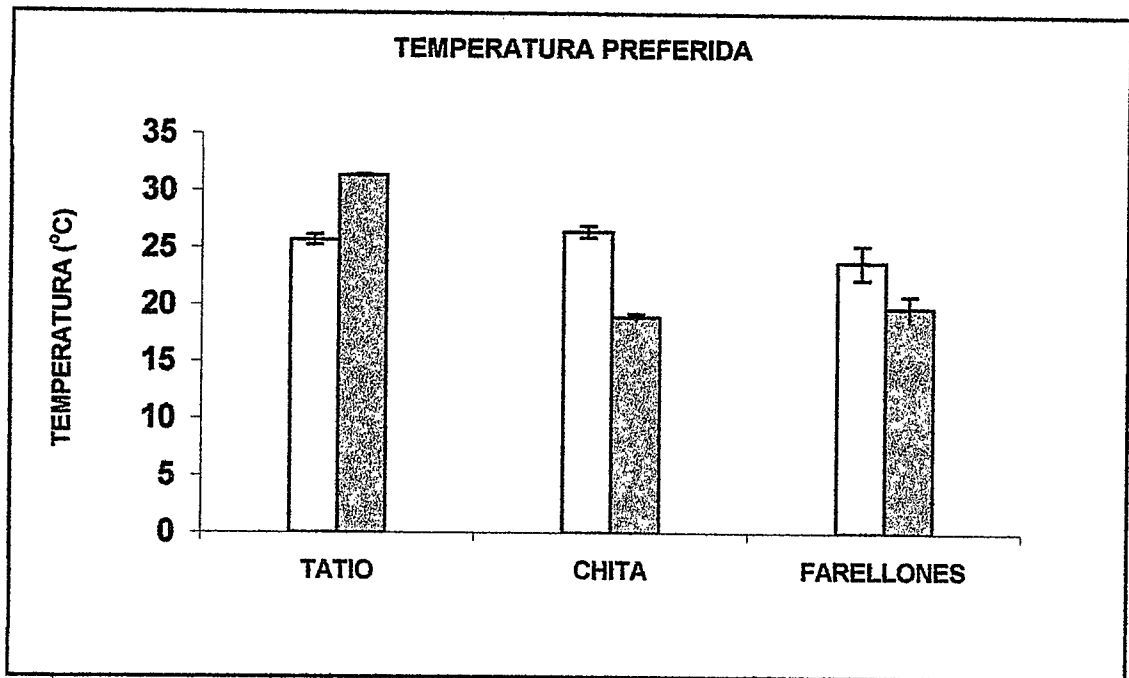


Figura 8 Temperatura medida en lugares con larvas (columna vacía) y sin larvas (columna llena) en las localidades indicadas Promedio y error estándar.

3.2 Determinación del metabolismo

Para todas las localidades y temperaturas medidas la Tasa metabólica presenta una relación alométrica con el peso de los ejemplares. Los parámetros para el conjunto de las curvas obtenidas se muestran individualmente en la Tabla 4.

La Tasa Metabólica corregida a un peso de 0,1 g de las larvas de las distintas localidades resulta ser relativamente distintas entre ellas, siendo además, todas mayores a 25 °C que a 15 °C (Figura 9). Un ANOVA de dos vías mostró que la Localidad ($F_{(5,163)}= 10.52, p<0.001$) y la temperatura ($F_{(1,163)}= 970.62, p<0.001$) tienen efecto sobre la Tasa Metabólica, existiendo una interacción entre ambas ($F_{(1,63)}= 11.04, p<0.001$). La Tabla 5 muestra los resultados de un test a posteriori Tukey. Para cada localidad, en todos los casos existió una diferencia significativa entre la Tasa Metabólica medida a 15 y 25°C, sin embargo, no se observa un patrón claro de diferencias entre las localidades medidas a 15 y 25°C. Para ambas temperaturas El Tatio resulta ser distinto de las otras localidades. Para cada localidad se calculó el Q_{10} resultante de dividir la Tasa Metabólica corregida obtenida a 25 y 15°C.

No se registró un cambio agudo en la pendiente que representa la tasa metabólica de cada ejemplar para todas las localidades, al permitir que los valores de porcentaje de saturación de oxígeno al que fueron expuestas las larvas en la cámara metabólica alcanzara el 30 % del valor inicial de 100 % de saturación, es decir 3,36 mg O₂ l⁻¹ para 15 °C y de 2,47 mg O₂ l⁻¹ para 25 °C. Estos valores son menores a los contenidos de oxígeno disuelto determinados en el ambiente de las larvas, en particular son mayores a los detectados en la localidad de El Tatio.

Tabla 4 Resultados de la regresión potencial entre tasa metabólica y el peso. a y b son los coeficientes de la ecuación $MS = a * W^b$, donde MS es el Metabolismo de rutina (ml O₂ / h) y W es el peso de la larva en g. Para cada localidad se ha calculado el Q₁₀.

| Localidad de origen | Temperatura Mantenimiento | a | b | N | r ² | Q ₁₀ |
|---------------------|---------------------------|--------|--------|----|----------------|-----------------|
| Zapahuira | 15 °C | 0,2319 | 0,8202 | 12 | 0,8035 | 2,6 |
| | 25°C | 0,6072 | 0,8103 | 14 | 0,9376 | |
| Chusmiza | 15 °C | 0,2825 | 0,8327 | 27 | 0,9689 | 1,9 |
| | 25°C | 0,8714 | 1,0364 | 13 | 0,9487 | |
| Tatio | 15 °C | 0,3251 | 0,8495 | 16 | 0,9676 | 1,8 |
| | 25°C | 0,6466 | 0,8464 | 13 | 0,9818 | |
| Chita | 15 °C | 0,2895 | 0,8185 | 17 | 0,9780 | 1,7 |
| | 25°C | 0,6179 | 0,8627 | 15 | 0,9390 | |
| Caspana | 15 °C | 0,2564 | 0,8621 | 12 | 0,8940 | 2,6 |
| | 25°C | 0,6219 | 0,8175 | 11 | 0,9637 | |
| Farellones | 15 °C | 0,3535 | 0,9477 | 16 | 0,9637 | 1,9 |
| | 25°C | 0,6297 | 0,8621 | 10 | 0,8801 | |

Tabla 5 Resumen del test de Tukey usado para comparar las tasas metabólicas corregidas a un peso de 0,1 g, obtenidas para larvas mantenidas a 15 y 25°C

| 15 °C | Zapahuira | Chusmiza | Tatio | Chita | Caspana | Farellones |
|------------|-----------|----------|-------|-------|---------|------------|
| Zapahuira | -- | n.s. | ** | n.s. | n.s. | n.s. |
| Chusmiza | n.s. | -- | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Tatio | ** | n.s. | -- | n.s. | ** | ** |
| Chita | n.s. | n.s. | n.s. | -- | n.s. | n.s. |
| Caspana | n.s. | *** | ** | n.s. | -- | n.s. |
| Farellones | n.s. | *** | ** | n.s. | n.s. | -- |
| 25 °C | | | | | | |
| Zapahuira | -- | ** | n.s. | *** | n.s. | *** |
| Chusmiza | ** | -- | n.s. | n.s. | * | n.s. |
| Tatio | n.s. | n.s. | -- | ** | n.s. | *** |
| Chita | *** | n.s. | ** | -- | *** | n.s. |
| Caspana | n.s. | ** | n.s. | *** | -- | *** |
| Farellones | *** | n.s. | *** | n.s. | *** | -- |

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001

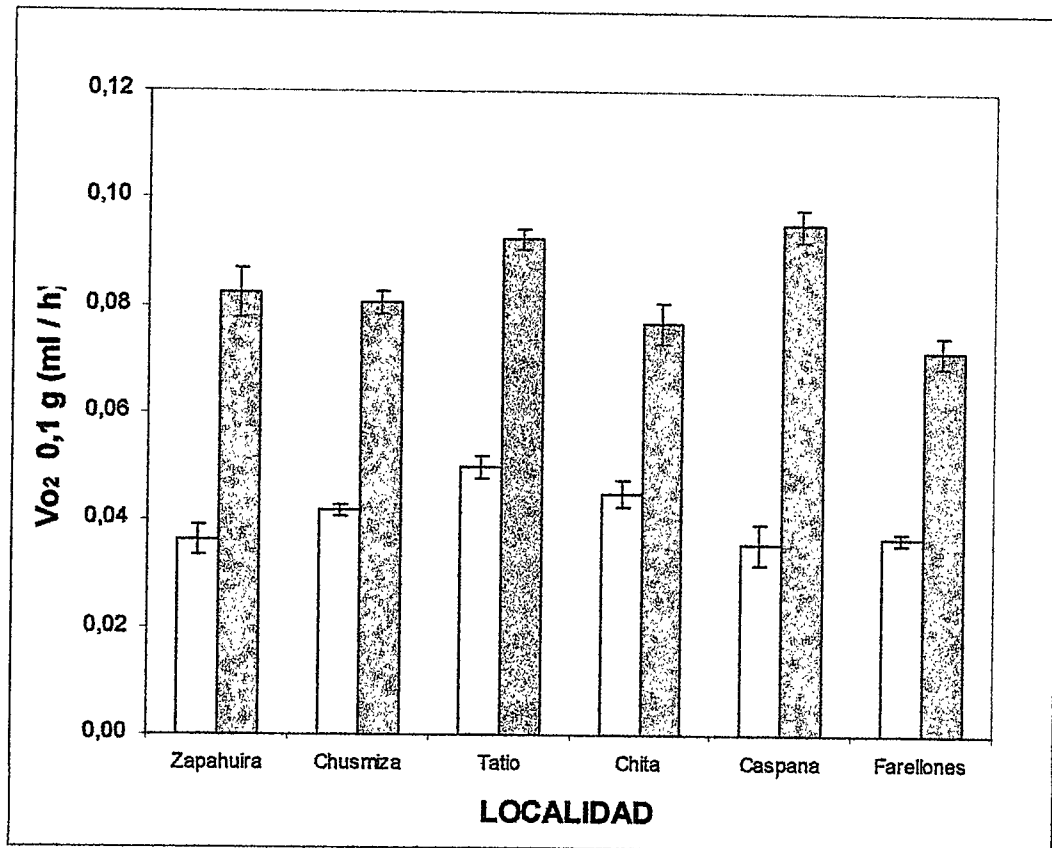


Figura 9 Tasa metabólica de larvas de *Bufo spinulosus* de 0,1 g (ver texto) provenientes de diferentes localidades del norte y centro de Chile, aclimatadas a 15 °C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error representan el error estándar.

3.3 Efecto de la procedencia geográfica sobre el tamaño a la metamorfosis.

Las larvas provenientes de diferentes localidades presentan diferencias en los pesos que alcanzan a la metamorfosis (Figura 10) bajo las mismas condiciones de densidad (5 ind/600 ml), temperatura de ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) y alimentación (ANOVA de una vía para Localidad $F_{(6,70)} = 18.60$, $p < 0.001$). El test a posteriori de Tukey mostró que las larvas provenientes de El Tatio presentan los mayores tamaños, Chita y Farellones tamaños similares e intermedios, y las de Farellones alcanzaron los menores tamaños. No existió diferencia entre el tamaño alcanzado entre las larvas que correspondían a tres conjuntos de hermanas completas y las que resultan de una mezcla de ellas.

3.4 Efecto de la variación de la temperatura sobre el tamaño a la metamorfosis.

Un régimen variable de temperatura no provocó un cambio significativo en el peso que alcanzan a la metamorfosis, siendo solo importante la localidad de origen (Figura 11). Un ANOVA de dos vías mostró que solo la Localidad resulta relevante ($F_{(4,105)} = 20.66$, $p < 0.001$) y no así la diferencia en el régimen térmico al que fueron sometidas ($F_{(1,105)} = 0.99$, $p > 0.3$) ni la interacción entre ellas ($F_{(2,105)} = 1.62$, $p > 0.3$). El test a posteriori de Tukey mostró que las larvas provenientes de El Tatio presentan los mayores tamaños, que las larvas de Chita presentan tamaños intermedios, y que las larvas de Farellones alcanzaron los menores tamaños y no existió diferencia entre el tamaño alcanzado entre las larvas que correspondían a tres conjuntos de hermanas completas y las que resultan de una mezcla de ellas.

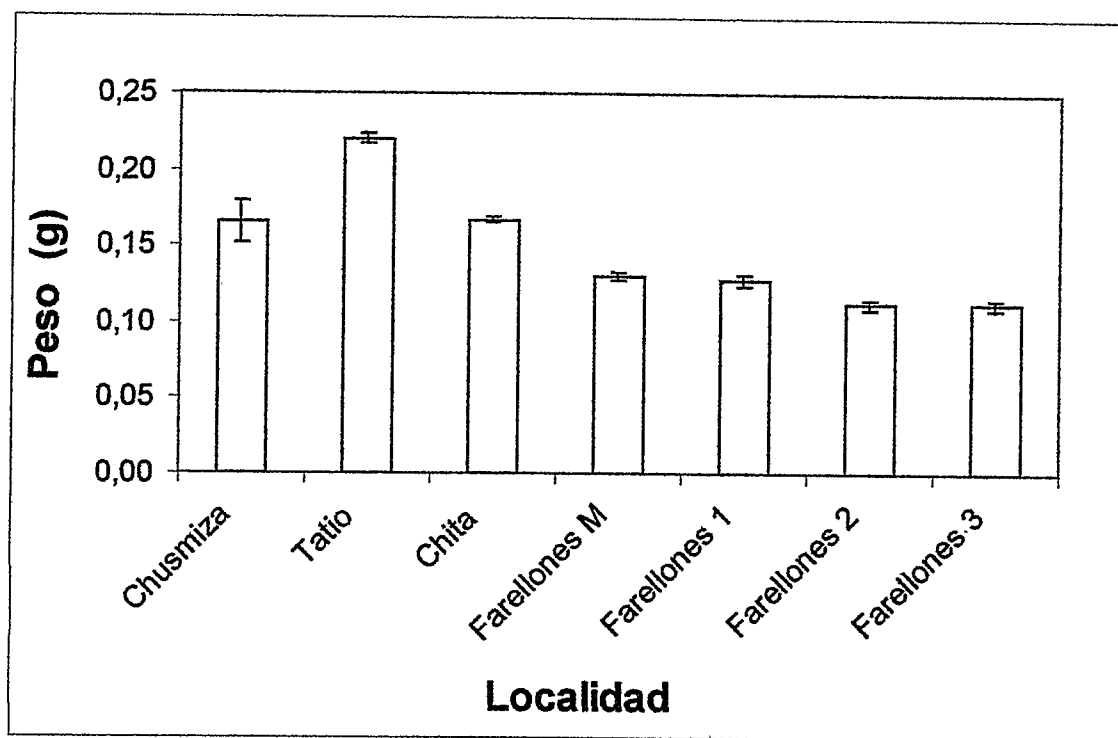


Figura 10 Peso que alcanzan a la metamorfosis larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de diferentes localidades del norte y centro de Chile, en iguales condiciones de temperatura (25 °C), alimentación (lechuga hervida) y densidad (5 ind/600 ml). Las barras de error representan el error estándar.

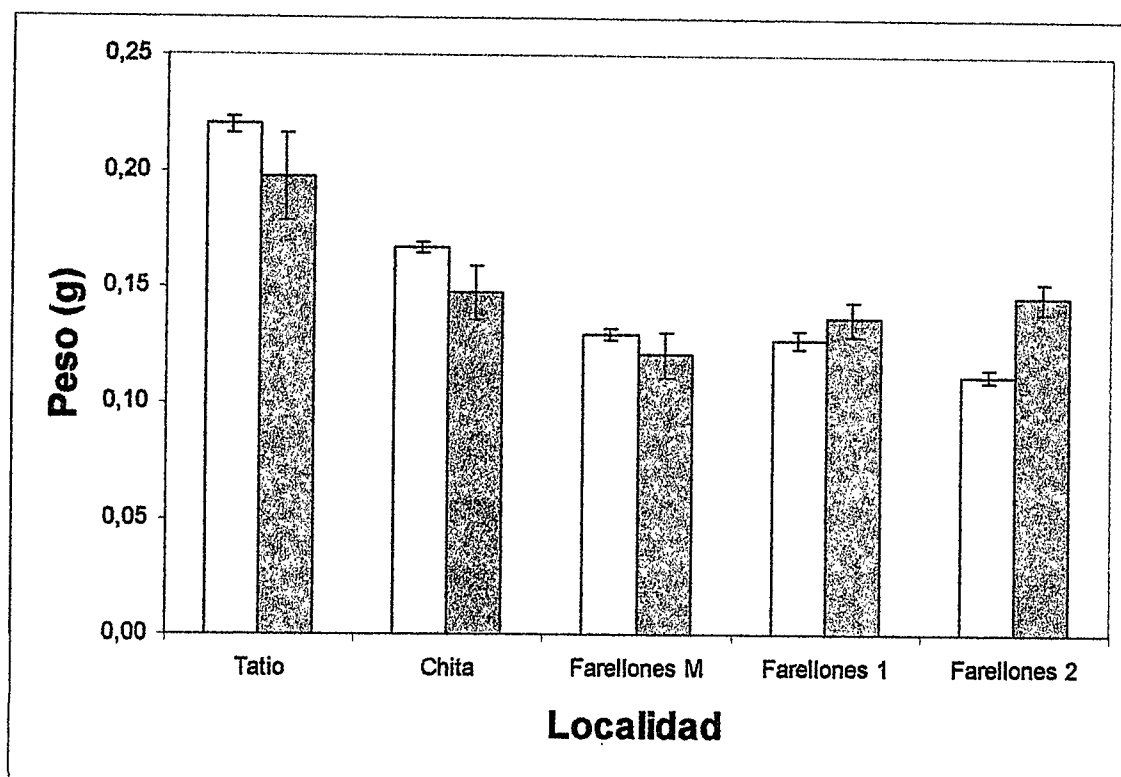


Figura 11 Peso que alcanzan a la metamorfosis larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de diferentes localidades del norte y centro de Chile, aclimatadas a un régimen constante de temperatura de 25 °C (columnas vacías) y a un régimen variable entre 15 y 25 °C (columnas llenas), en iguales condiciones de alimentación (lechuga hervida) y densidad (5 ind/600 ml). Las barras de error representan el error estándar.

3.5 Efecto de la temperatura y densidad sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis.

Para las larvas provenientes de Chusmiza tanto la temperatura como la densidad tuvieron efecto sobre el tamaño que alcanzan a la metamorfosis, las tasas de crecimiento y el tiempo que requieren para alcanzar la metamorfosis (Tabla 6). El tamaño a la metamorfosis fue mayor en los individuos mantenidos a 15°C y menores densidades (Figura 12a), (ANOVA dos vías, Temperatura $F_{(1,478)} = 515.18$, $p < 0.0001$; Densidad $F_{(3,478)} = 26,94$ $p < 0,0001$, Interacción $F_{(3,478)} = 9.16$, $p < 0.0001$). El análisis a posteriori de Tukey muestra que las mayores diferencias se verifican a 15°C. Las tasas de crecimiento son mayores a temperaturas mas altas y menores densidades (Figura 12b). (ANOVA dos vías, Temperatura $F_{(1,478)} = 515.18$, $p < 0.0001$; Densidad $F_{(3,478)} = 26,94$ $p < 0,0001$, Interacción $F_{(3,478)} = 9.16$, $p < 0.0001$). El análisis a posteriori de Tukey muestra que a 25°C todas las densidades presentan tasas de crecimiento diferentes, mientras que a bajas temperaturas sólo la tasa crecimiento a la densidad más alta resulta distinta. El tiempo que demoran en alcanzar las larvas la metamorfosis es mayor a bajas temperaturas y mayores densidades (Figura 12c). (ANOVA dos vías, Temperatura $F_{(1,478)} = 5792.11$, $p < 0.0001$; Densidad $F_{(3,478)} = 115.25$ $p < 0,0001$, Interacción $F_{(3,478)} = 63.67$, $p < 0.0001$). El análisis a posteriori de Tukey muestra que a 25°C las edades son todas diferentes, sin embargo a 15°C solo resulta diferente la edad a densidad 45.

3.6 Efecto de la dieta sobre el tamaño alcanzado en la metamorfosis.

La dieta tanto a 15°C como a 25°C tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento, el tamaño que alcanzan a la metamorfosis y el tiempo requerido para alcanzarla, en condiciones de igual densidad (15 ind/600 ml) (Tabla 7). El tamaño que alcanzan a la metamorfosis es mayor en los individuos alimentados con DR y mantenidos a 15°C (Figura 13a), no existió un efecto sinérgico entre ellos (ANOVA dos vías, Temperatura $F_{(1,142)} = 458.89$, $p < 0.0001$; Dieta $F_{(1,142)} = 72.38$ $p < 0,0001$, Interacción $F_{(1,142)} = 2.65$, $p > 0.1$). El análisis a posteriori de Tukey muestra que existen diferencias entre todos los valores obtenidos para los distintos tratamientos. De manera similar la temperatura y la dieta afectan la tasa de crecimiento (Figura 13b), existiendo un efecto sinérgico entre estos dos factores, observándose las mayores tasas de crecimiento a 25°C con dieta rica (ANOVA dos vías, Temperatura $F_{(1,142)} = 839.16$ $p < 0.0001$, Dieta $F_{(1,142)} = 188.06$ $p < 0,0001$, Interacción $F_{(1,142)} = 44.78$, $p < 0.001$). El análisis a posteriori de Tukey muestra que existen diferencias entre todos los valores obtenidos para los distintos tratamientos. El tiempo a la metamorfosis es menor a 25°C y DR (Figura 13c) (ANOVA dos vías, Temperatura $F_{(1,142)} = 7491.29$ $p < 0.0001$, Dieta $F_{(1,142)} = 44.07$ $p < 0,0001$, Interacción $F_{(1,142)} = 27.37$, $p < 0.001$). El análisis a posteriori de Tukey muestra 15°C no hay un efecto de la dieta sobre la edad a la que alcanzan la metamorfosis a 15°C.

Tabla 6 Número de individuos que alcanzaron la metamorfosis (n), promedio de peso en gramos que alcanzaron a la metamorfosis (Peso), crecimiento en miligramos por día (Crecimiento) y edad a la que alcanzaron la metamorfosis en días, de larvas de Chusmiza mantenidas a dos temperaturas y 4 diferentes densidades (individuos / 600 ml).

| Densidad | N | Peso (g) | Crecimiento mg/d | Edad (d) |
|----------|-----|--------------|------------------|------------|
| 15 °C | | | | |
| 5 | 12 | 0,385 ±0,026 | 1,548 ±0,128 | 252,1 ±6,0 |
| 15 | 36 | 0,338 ±0,011 | 1,474 ±0,062 | 232,8 ±4,3 |
| 30 | 58 | 0,310 ±0,012 | 1,285 ±0,057 | 245,0 ±2,8 |
| 45 | 90 | 0,250 ±0,006 | 0,981 ±0,029 | 258,0 ±1,8 |
| 25 °C | | | | |
| 5 | 20 | 0,166 ±0,014 | 6,384 ±0,289 | 29,4 ±1,0 |
| 15 | 51 | 0,126 ±0,005 | 3,833 ±0,111 | 33,5 ±0,7 |
| 30 | 108 | 0,106 ±0,004 | 2,035 ±0,070 | 53,3 ±1,2 |
| 45 | 139 | 0,114 ±0,006 | 1,790 ±0,122 | 65,0 ±1,2 |

Tabla 7 Número de individuos que alcanzaron la metamorfosis (n), promedio de peso en gramos que alcanzaron a la metamorfosis (Peso), crecimiento en miligramos por día (Crecimiento) y edad a la que alcanzaron la metamorfosis en días, de larvas de Chusmiza mantenidas a una densidad de 15 ind/600ml, mantenidas a dos temperaturas y alimentados con dos dietas de diferente calidad.

| Dieta | N | Peso (g) | Crecimiento mg/d | Edad (d) |
|-------|----|--------------|------------------|------------|
| 15 °C | | | | |
| DP | 36 | 0,338 ±0,011 | 1,474 ±0,062 | 232,8 ±4,3 |
| DR | 14 | 0,464 ±0,039 | 2,096 ±0,191 | 224,5 ±5,3 |
| 25 °C | | | | |
| DP | 51 | 0,126 ±0,005 | 3,833 ±0,111 | 33,5 ±0,7 |
| DR | 46 | 0,197 ±0,005 | 7,852 ±0,149 | 25,1 ±0,5 |

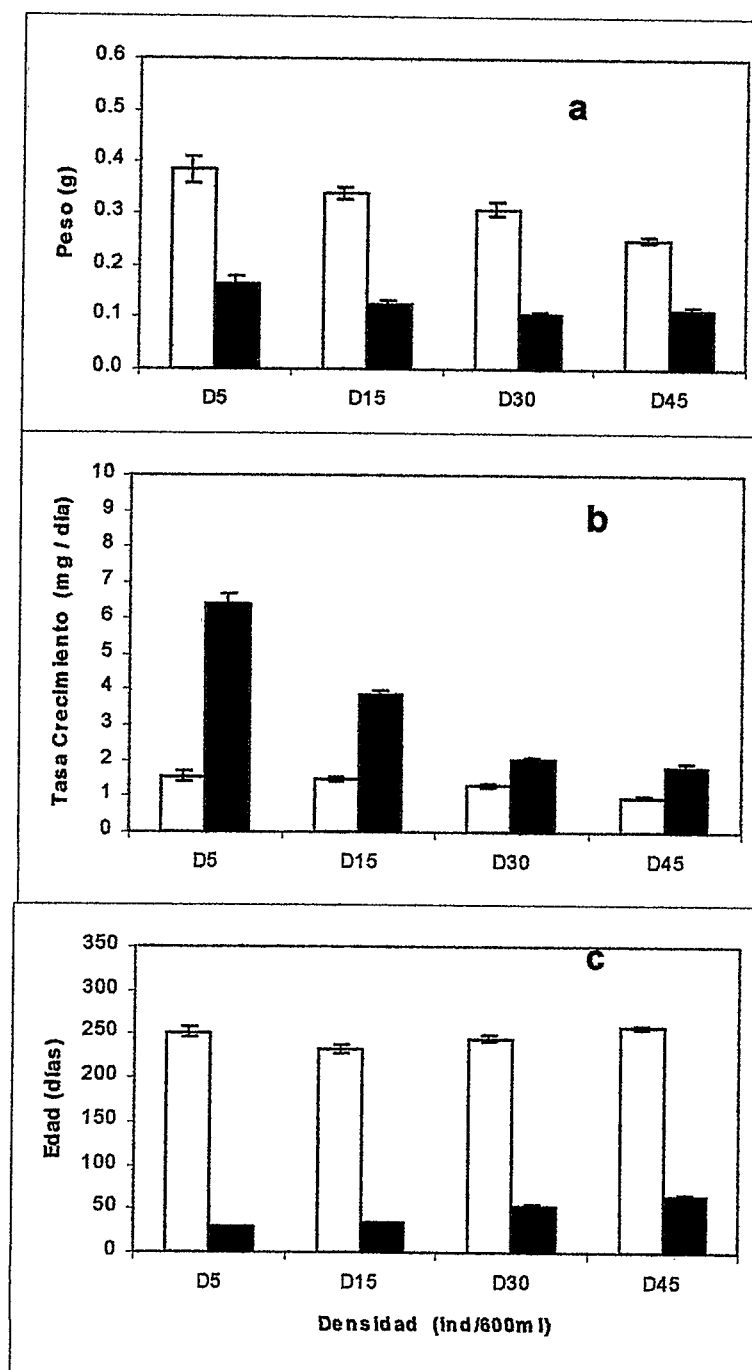


Figura 12 Peso que alcanzan a la metamorfosis (a), Tasa de Crecimiento (b) y Edad a la metamorfosis (c) de larvas mantenidas a 4 diferentes densidades y dos temperaturas 15 °C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error representan el error estándar.

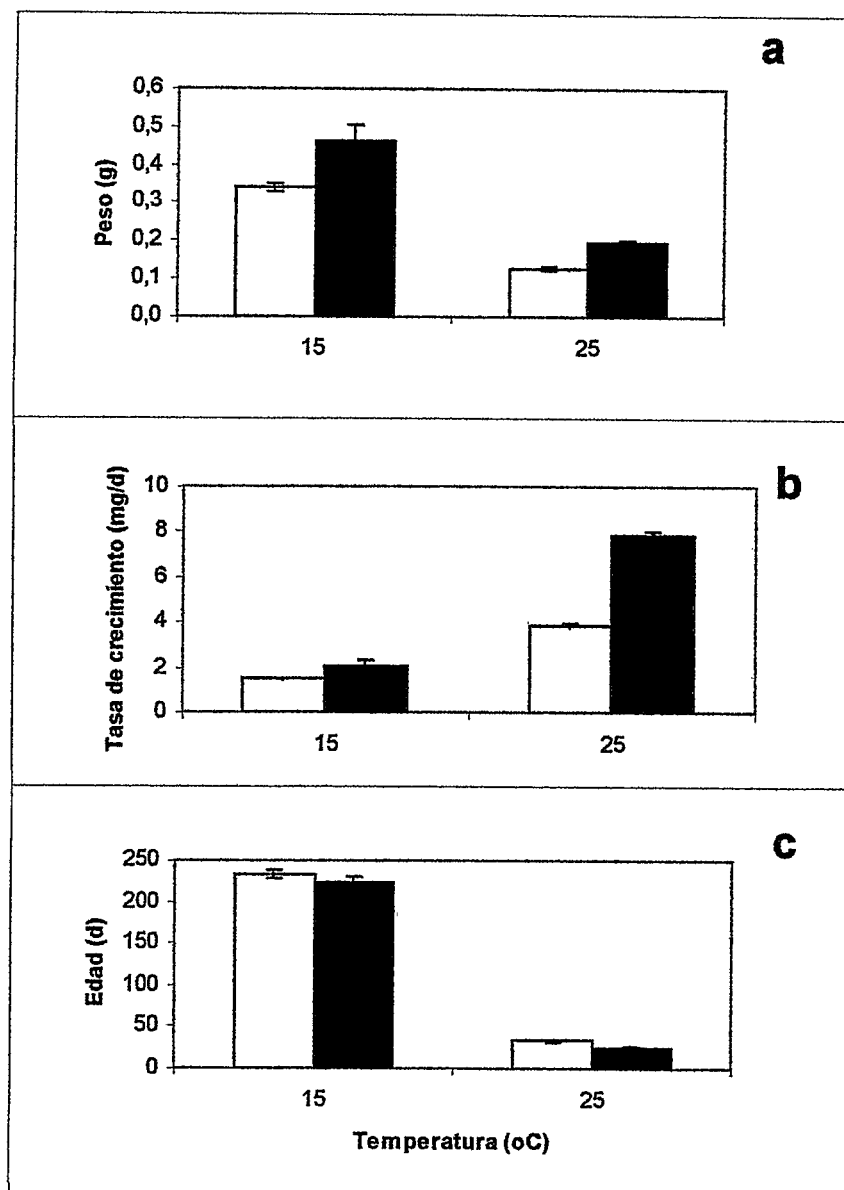


Figura 13 Peso que alcanzan a la metamorfosis (a), Tasa de Crecimiento (b) y Edad a la metamorfosis (c) de larvas alimentadas lechuga (columnas vacías) y espirulina (columnas llenas) mantenidas a 25 °C y densidad de 15 ind / 600 ml. Las barras de error representan el error estándar.

3.7 Efecto del origen geográfico y dieta sobre el crecimiento y tamaño a la metamorfosis.

Tanto el origen de las larvas como la dieta tienen efectos sobre el tamaño a la metamorfosis, el tiempo a la metamorfosis y las tasa de crecimiento (Tabla 8). La dieta y el origen afectan el tamaño que alcanzan a la metamorfosis, siendo los individuos de Chusmiza más grandes, de menor edad y sensibles a la dieta que los de Farellones (Figura 14a) (ANOVA dos vías, Localidad $F_{(1,168)} = 98.06$ $p < 0.0001$, Dieta $F_{(1,168)} = 65.00$ $p < 0.0001$, Interacción $F_{(1,168)} = 49.00$, $p < 0.0001$). Un test a posteriori de Tukey muestra que estas diferencias se deben a que las larvas de Chusmiza alimentadas con DR alcanzan tamaños mayores. Para la tasa de crecimiento, el origen y la dieta afectan esta variable (Figura 14b), siendo mayores con DR en las larvas de Chusmiza (ANOVA dos vías, Localidad $F_{(1,168)} = 2090.65$ $p < 0.0001$, Dieta $F_{(1,168)} = 38.74$ $p < 0.0001$, Interacción $F_{(1,168)} = 56.63$, $p < 0.001$), y un test de Tukey muestra que no hay diferencias entre dietas para las larvas de Farellones, la que si se observó para las larvas de Chusmiza. El tiempo que requirieron las larvas de Farellones para alcanzar la metamorfosis es mayor al de Chusmiza existiendo, además, diferencias debido a la dieta (Figura 14c) (ANOVA dos vías, Localidad $F_{(1,168)} = 1548.58$ $p < 0.0001$, Dieta $F_{(1,168)} = 173.97$ $p < 0.0001$, Interacción $F_{(1,168)} = 169.00$, $p < 0.001$). El test a posteriori de Tukey mostró que solo las edades de las larvas de Farellones resultan iguales a las dos dietas.

Tabla 8 Número de individuos que alcanzaron la metamorfosis (n), promedio de peso en gramos que alcanzaron a la metamorfosis (Peso), crecimiento en miligramos por día (Crecimiento) y edad a la que alcanzaron la metamorfosis en días, de larvas mantenidas a 25 °C a una densidad de 15 ind/600ml alimentados con dos dietas de diferente calidad (DP = Lechuga; DR = Espirulina), en larvas provenientes de dos localidades.

| Localidad | N | Peso (g) | | Crecimiento mg/d | | Edad (d) | |
|-------------|----|----------|--------|------------------|--------|----------|------|
| Dieta Rica | | | | | | | |
| Farellones | 38 | 0,115 | ±0,003 | 1,606 | ±0,055 | 73,8 | ±2,1 |
| Chusmiza | 51 | 0,126 | ±0,005 | 3,833 | ±0,111 | 33,5 | ±0,7 |
| Dieta Pobre | | | | | | | |
| Farellones | 38 | 0,120 | ±0,004 | 1,624 | ±0,071 | 75,2 | ±1,2 |
| Chusmiza | 46 | 0,197 | ±0,005 | 7,852 | ±0,149 | 25,1 | ±0,5 |

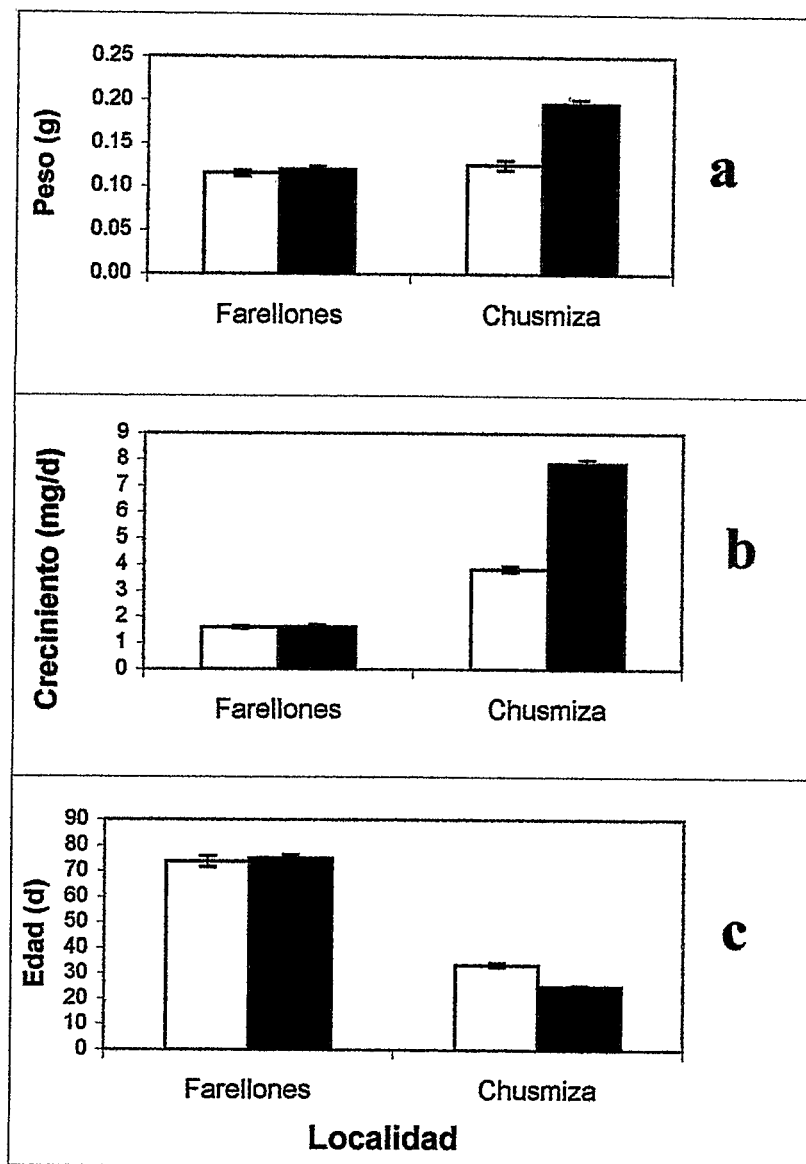


Figura 14 Peso que alcanzan a la metamorfosis (a), Tasa de Crecimiento (b) y Edad a la metamorfosis (c) de larvas alimentadas lechuga (columnas vacías) y espirulina (columnas llenas) mantenidas a 25 °C y densidad de 15 ind / 600 ml provenientes de las localidades de Farellones y Chusmiza. Las barras de error representan el error estándar.

3.8 Calidad del agua de las cajas experimentales

Durante el desarrollo de los experimentos se controló el pH, el oxígeno disuelto y la conductividad de las cajas debido a los productos de excreción. La temperatura y la densidad afectaron el pH y la conductividad de las cajas experimentales (ANOVA: Temperatura $F_{(1,16)} = 190.90$, $p < 0.0001$ Densidad $F_{(1,16)} = 116.51$, $p < 0.0001$ para pH; Temperatura $F_{(1,16)} = 21.63$, $p < 0.001$ Densidad $F_{(1,16)} = 7.10$, $p < 0.001$ para conductividad). Para el contenido de oxígeno, solo resultó significativo el efecto de la temperatura (ANOVA Temperatura $F_{(1,16)} = 241.42$, $p < 0.0001$ Densidad $F_{(1,16)} = 0.17$, $p > 0.9$).

3.9 Efecto de dieta, temperatura y localidad sobre tasa de asimilación.

Calidad de la dieta

Las dietas utilizadas resultaron efectivamente distintas en cuanto a su contenido de ceniza, energía y nitrógeno. La DP tuvo un 11,22 % de ceniza en comparación con 6,90 % de la DR. En relación con su contenido de energía, la dieta pobre aporta por gramo de materia orgánica (Peso seco libre de ceniza) 10,23 KJ y la DR 14,21. El aporte de nitrógeno total de la DP fue de 22,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ frente a 47,53 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de la DR.

Tasas de Asimilación

Las tasas de asimilación determinadas para DP y DR resultan ser bastantes altas, con valores que oscilaron entre los 75 % y 91 %, dependiendo de la temperatura (Tabla 9). Tanto para la DP (Figura 15) como para DR (Figura 16), no se observaron diferencias entre las tasas de asimilación en larvas de diferentes localidades de origen. (ANOVA, Tabla 10). La temperatura y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la

asimilación (Tabla 2). Un test de Tukey mostró que a 15 °C las asimilaciones a las dos dietas son distintas ($p < 0,05$), que las asimilaciones entre de ambas dietas a las dos temperaturas son distintas ($p < 0,001$), pero que a 25 °C la asimilación entre ambas dietas no son diferentes ($p > 0,5$).

Tabla 9 Valores de tasa de asimilación (digestibilidad aparente) para larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de distintas localidades, mantenidas a dos temperaturas (15 y 25 °C) y alimentadas con una Dieta Pobre y Dieta Rica (ver texto).

| Localidad | Dieta Pobre | | Dieta Rica | |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 15 °C | 25 °C | 15 °C | 25 °C |
| | Promedio | Promedio | Promedio | Promedio |
| Chusmiza | 78,18 ± 0,66 | 82,57 ± 1,08 | 86,97 ± 0,31 | 89,23 ± 2,25 |
| Tatio | 75,71 ± 1,02 | 84,59 ± 0,47 | 90,94 ± 0,22 | 88,06 ± 0,97 |
| Chita | 76,88 ± 1,59 | 84,32 ± 1,36 | 91,28 ± 0,30 | 87,75 ± 1,15 |
| Farellones | 77,97 ± 2,16 | 82,13 ± 1,88 | 89,60 ± 0,21 | 89,39 ± 0,99 |

Tabla 10 Resultado ANOVA para tasas de asimilación de larvas de *Bufo spinulosus* de diferentes localidades de origen, mantenidas a dos temperaturas (15 y 25 °C) y alimentadas con una dieta pobre y rica (ver texto).

| Factor | g.l. efecto | SM efecto | g.l. error | SM error | F | p |
|---------------------------------|-------------|-----------|------------|----------|---------|----------|
| Localidad | 3 | 0,00037 | 37 | 0,00096 | 0,386 | 0,7630 |
| Dieta | 1 | 0,19914 | 37 | 0,00096 | 205,730 | < 0,0001 |
| Temperatura | 1 | 0,01145 | 37 | 0,00096 | 11,829 | 0,0014 |
| Localidad x Dieta | 3 | 0,00026 | 37 | 0,00096 | 0,276 | 0,8418 |
| Localidad x Temperatura | 3 | 0,00073 | 37 | 0,00096 | 0,756 | 0,5256 |
| Dieta x Temperatura | 1 | 0,02815 | 37 | 0,00096 | 29,09 | < 0,0001 |
| Localidad x Dieta x Temperatura | 3 | 0,00328 | 37 | 0,00096 | 3,390 | 0,0279 |

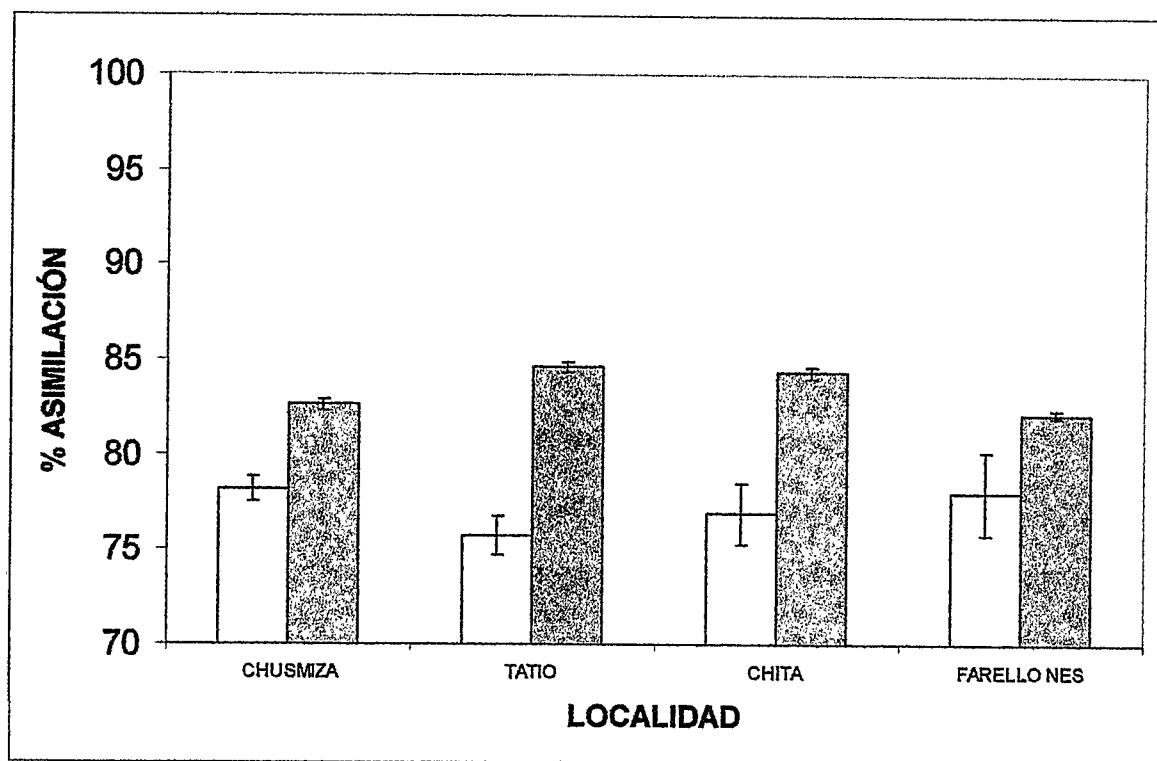


Figura 15 Asimilación de Dieta Pobre (Lechuga) en larvas de *Bufo spinulosus* provenientes de distintas localidades y mantenidas a dos temperaturas: 15° C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error corresponden al error estándar.

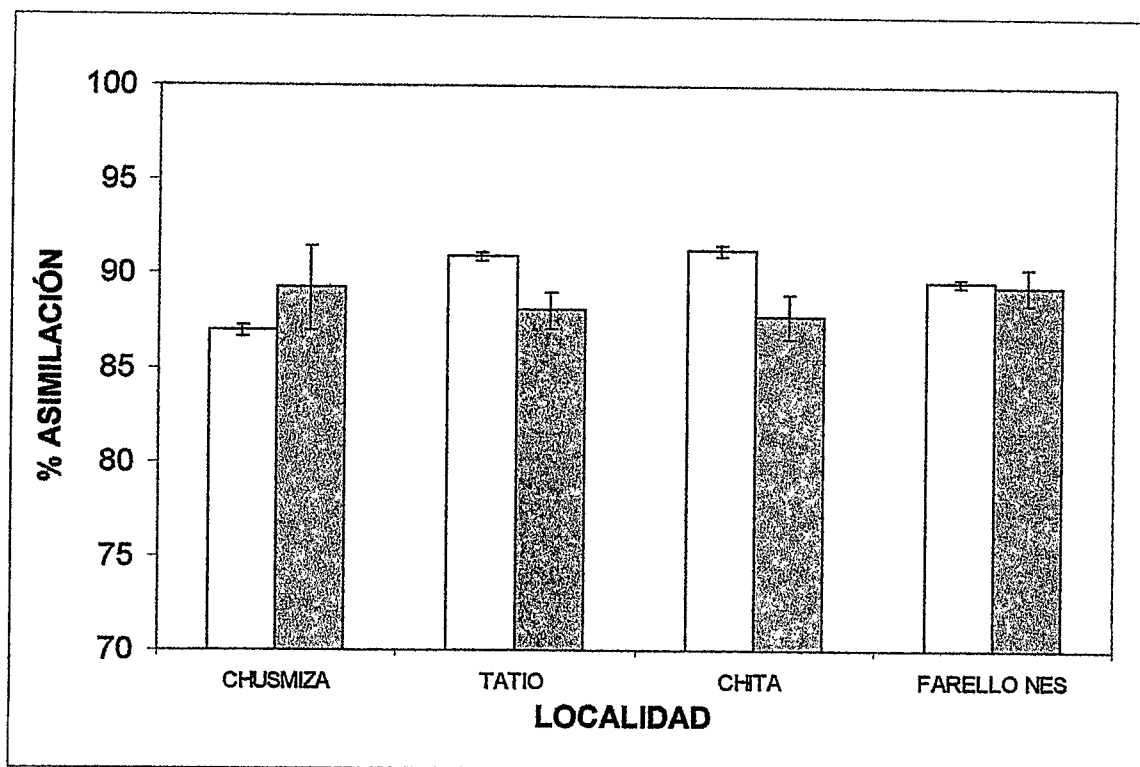


Figura 16 Asimilación de Dieta Rica (Espirulina) en larvas de Bufo spinulosus provenientes de distintas localidades y mantenidas a dos temperaturas: 15° C (columnas vacías) y 25 °C (columnas llenas). Las barras de error corresponden al error estándar.

4 DISCUSIÓN

El ambiente donde se desarrollan las larvas de *B. spinulosus* de la localidad de El Tatio representa un caso claramente distinto al que enfrentan otras poblaciones altoandinas de Chile, debido a su restringido régimen de variación diaria y anual en la temperatura. En las otras localidades estudiadas existe una oscilación térmica diaria de alrededor de entre 11 a 18 °C, a excepción de El Tatio en que no hay diferencias significativas entre la temperatura registrada en el día y la noche. Particularmente interesante resulta la localidad de Chita, que si bien está a una altura levemente inferior a la de El Tatio, sus parámetros de calidad de agua son bastante similares incluida la temperatura registrada durante el día. Sin embargo, existe una diferencia significativa en cuanto a las temperaturas registradas de noche. Similar patrón de diferencias se observa al comparar estas dos localidades en sus temperaturas invierno – verano, siendo similares las registradas durante el día en el verano y significativamente distintas las registradas en invierno. Por lo tanto, la población que habita en El Tatio esta sometida a un régimen particular de temperatura, asimilable a un sistema tropical, pero de altura, sin mayores oscilaciones térmicas diarias ni estacionales. Esto que representa un caso bastante particular, no descrito en la literatura.

Otro de los factores abióticos que resulta relevante considerar, es la disponibilidad de oxígeno para las larvas. La variación en el oxígeno disponible para los organismos acuáticos, puede tener importantes consecuencias en la actividad que los éstos puedan ejercer (Priede 1985), en particular para las larvas de anfibios (McInteryre & McCollum 2002), en el que puede afectar su capacidad de escapar de depredadores o conseguir

alimento. Para el caso de las poblaciones de *B. spinulosus* estudiadas, los valores de oxígeno disuelto a los que las larvas fueron expuestas durante las determinaciones de consumo de oxígeno, no provocaron alteraciones significativas en su Tasa Metabólica. A pesar de que la determinación de la presión parcial crítica de oxígeno para las larvas no formó parte de los objetivos de esta tesis, el método experimental utilizado permitió detectar que las larvas se comportaron como oxígeno reguladores (Rosenmann 1978), dentro de los rangos de disponibilidad de oxígeno a las que fueron expuestas. Dado que estos rangos son inferiores a los que las larvas disponen en sus condiciones naturales, se puede concluir que para las larvas de esta especie, el oxígeno disponible en sus ambientes naturales no representa una restricción. Esto concuerda con lo descrito por Ruiz et al.(1989) en relación con los valores hematológicos para ejemplares adultos de esta especie, y con lo indicado por Plenet et al.(1998) en cuanto a que el valor crítico de disponibilidad de oxígeno para las larvas de anuros está por debajo de los 3 mg l⁻¹.

La conductividad es una medida de la salinidad de las aguas. Las localidades estudiadas del norte, presentan valores mayores de conductividad que las de la zona central. A pesar de que se ha descrito el probable efecto que esta variable puede tener en el desempeño de los anuros (Tattersall & Wright 1996), Tatio y Chita presentan valores de la misma magnitud y sus tamaños corporales son significativamente distintos. De esta forma se puede descartar el efecto de esta variable. El mismo argumento se puede utilizar para descartar el efecto del pH.

En los experimentos desarrollados para todas las poblaciones estudiadas, no se detecta una compensación al aumento de la temperatura (Davenport 1992) en las larvas de esta especie, ya que su mantención a 25 °C durante tres semanas provocó un aumento

significativo en sus Tasas Metabólicas. Dado que la metamorfosis en esta especie a 25 °C se alcanza en un lapso de tiempo de alrededor de 30 días (Figura 12), es perfectamente posible afirmar que este aumento se verificará en las larvas durante todo su desarrollo. Este fenómeno ha sido descrito para individuos adultos y larvas de anfibios, pero en general ha sido asociado a especies que habitan en ambientes de baja variabilidad térmica. (Rome et al.1992, Laugen et al.2003). Por otra parte, se ha descrito que la existencia de compensación en ambientes variables, lo que permitiría a las larvas de anfibios independizarse del ambiente (Kam et al.2001). Por lo tanto, el que las larvas de *Bufo spinulosus* que habitan en ambientes de temperatura variable no presenten compensación metabólica, no esta de acuerdo con lo descrito en la literatura.

Los valores observados de Q_{10} se encuentran dentro de lo descrito para larvas de otras especies (ej. Kam 2001), sin embargo la sensibilidad al cambio en la temperatura resulta ser distinta entre las localidades. Los valores de Q_{10} se agrupan en dos: Zapahuira y Caspana con un Q_{10} de 2,6 y Chusmiza, Tatio, Chita y Farellones con un Q_{10} entre 1,7 y 1,9. Las poblaciones de Zapahuira y Caspana están sujetas a un régimen de temperaturas aparentemente similares durante el verano, a las encontradas en la localidad de Chusmiza, Chita y Farellones, siendo además su oscilación térmica día-noche similar. Sin embargo, los registros no corresponden a registros continuos, por lo que no disponemos de la información sobre la forma particular de estas oscilaciones diarias en la temperatura, y por lo tanto, de los tiempos a los que las larvas están expuestos a las mayores temperaturas. Si el Q_{10} esta asociado a la historia térmica que enfrentan las poblaciones y, asumiendo que estamos en presencia de poblaciones

genéticamente similares para la expresión de este carácter, estas diferencias podrían deberse a regímenes particulares de temperatura a las que las larvas estarían expuestas, los que no fueron detectados. Es necesario realizar estudios de seguimiento térmico de los ambientes de mayor longitud y precisión que los efectuados en la presente tesis, sobre todo en cuanto a las oscilaciones diarias de temperatura, de tal forma de poder valorar exactamente el tiempo de exposición de las larvas a las diferentes temperaturas.

Las tasas metabólicas de los individuos de la población de El Tatio no resultan totalmente diferentes de los provenientes de otras localidades, tanto a 15 como a 25 °C. Esto indica que a pesar de que la población de El Tatio esta sometida a un régimen de mayores y más estables temperaturas, su patrón general de respuesta es similar al de otras poblaciones, las que no están sujetas a este tipo tan particular de régimen térmico. Esto podría estar indicando que el tiempo transcurrido para esta población, no ha sido el suficiente para generar una diferencia genética asociada a los patrones de respuesta metabólica.

La interpretación, en términos adaptativos, de los patrones de respuesta a la aclimatación a la temperatura son generalmente hechos bajo la influencia de la hipótesis de la adaptación benéfica. Esta señala que “la aclimatación a un ambiente particular confiere a un organismo una ventaja en su desempeño sobre otro organismo que no ha temido la oportunidad de aclimatarse a ese ambiente particular” (Rome et al.1992, Woods & Harrison 2001). Bajo esta hipótesis, el hecho de que no exista compensación metabólica permitiría a las larvas beneficiarse de las mayores temperaturas, aumentando sus tasas de crecimiento y particularmente de desarrollo, logrando alcanzar la

metamorfosis durante el período favorable del clima (antes de las nevazones de invierno o de la evaporación total de las pozas al final del verano). La selección activa por los microambientes que presentan mayor temperatura detectada en las larvas de esta especie refuerza esta hipótesis. A excepción de El Tatio, las larvas prefieren los microambientes de mayor temperatura disponibles, lo que podría estar acelerando el desarrollo y acortando el tiempo que demoran en metamorfosear. Por otra parte, si no se alcanza la metamorfosis en una temporada, al bajar la temperatura, un metabolismo deprimido permitiría ahorrar energía y sobrevivir hasta la próxima temporada favorable. Esta última posibilidad fue efectivamente detectada en la localidad de Chita, en la que durante el invierno de 2002 se observaron larvas activas a temperaturas de 4°C, y que presentaron tasas metabólicas de alrededor de un 11 % del promedio de las medidas a 15°C (Benavides, datos no publicados). Por lo que en este caso, la incapacidad de aclimatarse a la temperatura podría representar un beneficio para esta especie, debido al tipo de ambiente en el que habita.

En El Tatio, las larvas no prefieren los microhábitats de mayor temperatura disponible, prefiriendo temperaturas similares a las encontradas en otras localidades. Esto puede estar indicando que existe un límite sobre el cual la temperatura puede ser deletérea para las larvas. Esto podría deberse, por ejemplo, a un aumento del daño tisular asociado al aumento de la tasa metabólica, que podría redundar en una mayor mortalidad (Atkinson 1996, Laugen et al. 2003). Es probable entonces, que la temperatura preferida de alrededor de 25 °C de represente la temperatura cercana a la óptima para el desarrollo de esta especie.

La temperatura, la dieta y la densidad tiene un efecto general sobre el desarrollo y las características de los individuos recién metamorfoseados de *Bufo spinulosus*. La temperatura aparece como la variable ambiental de efecto más general en esta especie, siendo los individuos metamorfoseados a bajas temperaturas más viejos y más grandes. Este resultado concuerda con lo descrito para la generalidad de los ectotermos (Atkinson 1994, 1996).

Estudios sobre la metamorfosis en anfibios han producido dos tipos de modelos generales para explicar la variación en la edad y el tamaño a la metamorfosis (Twombly 1996). La diferencia entre ellos esta dada por la suposición de que el desarrollo larval permanece flexible o no a lo largo del desarrollo (Twombly 1996). Por una parte, Wilburg & Collins (1973) plantean que la edad y tamaño la metamorfosis es dependiente de la historia reciente de crecimiento de la larva, mientras que Leips & Travis (1994) plantean que existe una edad luego de la cual se puede afectar la tasa de crecimiento, no así la edad a la que se alcanza la metamorfosis. Ambos modelos plantean que, si se produce una disminución o aumento de la tasa de crecimiento en etapas tempranas del desarrollo, la metamorfosis de aquellos con mayor tasa de crecimiento se alcanzará en menor tiempo y a mayor tamaño. Dado que el modelo experimental planteado en la presente tesis consideró alimentación ad libitum, las trayectorias de crecimiento se pueden asumir distintas y constantes desde temprana edad para cada tratamiento distinto. Para cada temperatura experimental utilizada, el aumento en la tasa de crecimiento, provocado tanto por el efecto contragradiante de la densidad o positivo de la calidad de la dieta, provocan individuos que metamorfosean a menor edad y mayor tamaño, lo que concuerda con los modelos planteados. Sin embargo, si se mira el efecto global de las

dos temperaturas, el aumento de las tasas de crecimiento provocadas por la mayor temperatura, produce individuos de menor edad y mayor tamaño. La aparente contradicción entre estos resultados se resuelve al considerar que la temperatura no solo altera las tasas de crecimiento, sino que además, las tasas de desarrollo. En los modelos de Wilburg & Collins (1993) y Leips & Travis (1994) equivale no solo alterar la tasa de crecimiento, sino que además, el tamaño mínimo al que se puede alcanzar la metamorfosis. Así, a mayor temperatura existirá una mayor tasa de crecimiento, pero también la posibilidad de alcanzar la metamorfosis a menor tamaño (Atkinson 1996), por el incremento en la tasa de desarrollo. De esta forma el incremento en la tasa de crecimiento provocado por el aumento de la temperatura, generará individuos de menor tamaño y edad. Resulta entonces necesario precisar que para que los modelos de Wilburg & Collins (1993) y Leips & Travis (1994), el tamaño mínimo que se puede alcanzar a la metamorfosis si es alterado por el cambio en las tasas de crecimiento mediadas por la temperatura. Los resultados de la presente tesis muestran que existe un claro desacople entre la tasa de crecimiento y tasa de desarrollo cuando son alteradas por factores denso independientes, como la temperatura, no así cuando son alterados por factores denso dependientes, como la densidad.

El efecto negativo de la densidad sobre el crecimiento, ha sido descrito tanto en experimentos de laboratorio como en estudios de terreno (Newman 1994, 1994a, 1998, Reading & Clarke 1999, Brady & Griffiths 2000, Loman 2002). Es razonable pensar que en ambientes naturales, las condiciones de mayor densidad pueden provocar competencia intraespecífica por el alimento y espacio. Esto requiere necesariamente que el alimento y el espacio sean recursos limitados, como probablemente los son en las

pozas donde se verifica el desarrollo larval. Nuestros resultados muestran que en condiciones de alimentación ad libitum, las mayores densidades provocan de igual forma una disminución en el crecimiento y en el tamaño que alcanzan a la metamorfosis. Esto indica que en este caso, el efecto de la densidad debe estar mediado por otros factores, como puede ser: la interferencia física entre las larvas, la presencia de algún factor generado por las larvas que inhiba del crecimiento o, por un efecto sobre el crecimiento provocado por la alteración de las condiciones del agua en las cajas experimentales (D'Aniello et al.1989, Plenet et al.1998, Girish & Saidapur 1999, McIntyre & McCollum 2000, Warkentin 2002. A pesar del continuo recambio de agua a la que fueron sometidas las cajas experimentales, la densidad de las larvas y la temperatura afectaron el pH y la conductividad, las que sin embargo oscilaron entre un estrecho margen (pH 7,81 a 8,20; conductividad 861 a 1.348 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Se ha descrito que variaciones moderadas de pH pueden afectar las condiciones fisiológicas de las larvas, como su contenido de amonio (Tattersall & Wright, 1996), lo que eventualmente podría afectar su desarrollo. A pesar de lo estrecho de la variación de estas variables en las cajas experimentales, no es posible descartar su efecto. Será necesaria mayor experimentación para distinguir si los resultados observados son producto de la alteración de la la calidad del agua o de la existencia de algún factor químico específico liberado por las larvas.

Larvas de dos localidades respondieron de manera diferente a la calidad de la dieta utilizada. En las larvas de Farellones no se detectaron diferencias en cuanto a su crecimiento, tamaño y edad a la metamorfosis, entre las alimentadas con dieta rica y

pobre. Esto probablemente está mostrando que existe una diferencia entre ambas poblaciones, en cuanto a su capacidad de digerir los alimentos experimentales. En este contexto, las larvas de Farellones representaron un resultado inesperado, ya que al no verse afectadas sus tasas de crecimiento, tampoco lo fueron la edad y el tamaño alcanzado a la metamorfosis, lo que concuerda con los modelos planteados. Sin embargo, este resultado llama la atención del problema de la variación local que puede existir en cuanto a las respuestas de crecimiento y desarrollo.

La calidad del alimento sólo afecta el desarrollo, medido como la longitud del período larval, de las larvas mantenidas a 25°C. A 15°C no hubo efecto, a pesar de que sí existió una diferencia en las tasas de crecimiento mediada por la calidad de la dieta. Esta diferencia podría estar mediada por el efecto de la disponibilidad de proteína y su efecto sobre la tasa de crecimiento. Kupferberg (1997) señala que el crecimiento y el desarrollo de las larvas estarían limitados por la disponibilidad de proteína, de manera similar a lo descrito para otros herbívoros acuáticos (Matsson 1980). Se puede postular que, en las larvas de *Bufo spinulosus* (primariamente herbívoras) mantenidas a bajas temperaturas, la capacidad de asimilar el alimento estaría suficientemente deprimida, como para que una diferencia en su calidad resulte irrelevante, en cuanto a aporte efectivo de proteínas (Alvarez & Niciesá 2002). Sin embargo a 25°C, las mayores velocidades de adquisición y procesamiento del alimento, permiten que una diferencia en su calidad altere efectivamente la tasa de adquisición de proteína. De esta forma, a 25°C la dieta pobre restringe suficientemente el crecimiento, como para que se altere el desarrollo. Además, es probable que exista un umbral de crecimiento, sobre el cual se

afecta la tasa de desarrollo y bajo el cual el desarrollo se hace independiente del crecimiento. Esta explicación concuerda con lo observado, en cuanto al efecto global de la temperatura sobre el desarrollo y crecimiento, en el sentido de que, solo asociado a las mayores tasas de crecimiento global obtenidas a 25 °C, se observa el efecto inverso de la tasa de crecimiento sobre la tasa de desarrollo. Este efecto no se manifiesta a bajas temperaturas, en las que las tasas globales de crecimiento son mucho menores.

De los datos obtenidos en la presente tesis se observa que las tasas de asimilación aumentan con la temperatura y que además dependen del tipo de dieta consumida por las larvas de *Bufo spinulosus*. La tasa de asimilación de la DP se ve incrementada significativamente al aumentar la temperatura, sin embargo, este efecto no es significativo con la DR. La dieta pobre basada en lechuga hervida es consistentemente menos asimilada que la dieta basada en Espirulina.

El uso de la ceniza, como marcador de digestión, ha recibido críticas a raíz de que se ha detectado que algunos herbívoros son capaces de asimilarla (Bjorndal 1985), y que existe una variación individual de esta asimilación entre individuos de la misma especie (Benavides et al. 1986). Sin embargo, dado que en el presente caso se ha considerado el uso de las fecas producidas por un conjunto de individuos (15), se puede asumir que la variación individual se minimiza. Por otra parte, el objetivo del presente trabajo consistió en la comparación de las tasas entre individuos de la misma especie, por lo que la subestimación de las tasas, a raíz de la absorción de las cenizas o de la producción de las mismas por parte de las larvas, no aparece como relevante en términos estrictamente comparativos. La facilidad relativa de este método, que solo requiere la cuidadosa recolección de las fecas y su rápido procesamiento para evitar a

descomposición de las mismas, permitió hacer un estudio comparativo como una aproximación al problema.

El hecho de que la tasa de asimilación aumente con la temperatura no concuerda con los modelos planteados para la digestión en ectotermos. Por una parte, se ha planteado que existe una relación exponencial entre el tiempo de tránsito de los alimentos y la temperatura (Elliot 1972). Por lo tanto, a menores temperaturas el tiempo que permanecen los alimentos expuestos a la acción de las enzimas digestivas es mayor, favoreciendo la digestión de dietas de menor calidad (Sibly 1981). En las larvas de *Bufo spinulosus* el fenómeno observado es exactamente lo contrario, la asimilación de la dieta pobre aumenta con la temperatura. Una explicación para estos resultados, es que exista un efecto positivo de la temperatura sobre los sistemas enzimáticos responsables de la digestión (Hochachka & Somero 1984), que compensaría el menor tiempo de tránsito. Evidencia indirecta aparece apoyar esta conclusión, ya que las larvas de *Bufo spinulosus* prefieren los microambientes de temperatura cercana a los 25 °C, por sobre aquellos de temperatura menor o mayor presentes en su ambiente (Figura 8). Es razonable suponer que los sistemas enzimáticos presenten un ajuste que implique una mayor capacidad de digerir y asimilar a esta temperatura.

En el caso de la dieta rica, la ausencia del efecto de la temperatura puede deberse a la alta digestibilidad del alimento, ya que al ser una dieta artificial, constituida por elementos de alta absorción, hacen que probablemente a 15°C sea aun fácilmente digerido.

Las conclusiones de la presente tesis están limitadas por el hecho de haber utilizado dietas no consumidas en forma natural. Sin embargo, la lechuga ha ido

utilizada en numerosos trabajos experimentales con larvas de anfibios (Larse 1992), por lo que su uso en alguna medida permite hacer comparaciones. En la presente tesis, y en otros diversos trabajos con diferentes especies, la lechuga permite a las larvas alcanzar exitosamente la metamorfosis (Larse 1992), por lo que su uso aparece adecuado desde el punto de vista nutricional. Este es un problema común a muchos diseños experimentales, en los que se intenta estudiar en condiciones de laboratorio el desempeño de los organismos. En el caso de los anfibios, la experimentación de las variables que afectan el crecimiento, en particular el estudio de larvas creciendo en pozas, indica que los resultados obtenidos en laboratorio coinciden con los observados en la naturaleza. Lo observado en condiciones de laboratorio es un primer paso necesario para validar mecanismos y relaciones propuestas, las que idealmente luego deberían ser probadas en condiciones naturales.

La ausencia de un efecto de la localidad de origen de las larvas al menos para las dietas estudiadas, indica que en *Bufo spinulosus* no existe plasticidad en la expresión de la capacidad de asimilar los alimentos, o bien porque en esta especie no existe esta posibilidad de variación, o debido a que las larvas en las diferentes localidades consumen una dieta similar. No existe información sobre la dieta de las larvas de esta especie en las diferentes localidades. Sin embargo el autor ha observado la conducta de alimentación de las larvas en algunas localidades, detectando que a lo menos en El Tatio y Farellones las larvas consumen algas cianófitas. Muestras de estas algas resultan ser similares en su contenido de energía, 20,3 KJ/g y 21,0 KJ/g y de nitrógeno total, 77,8 y 80,1 ug/mg respectivamente (Benavides, datos no publicados), apoyando la hipótesis de

dietas similares. Sin embargo, es necesario el estudio sistemático de los contenidos estomacales para poder concluir con certeza sobre la similitud de las dietas.

El porque las larvas de El Tatio alcanzan tamaños mayores a la metamorfosis en iguales condiciones de alimentación y temperatura (Figura 10) no puede explicarse por una mayor capacidad de digestión y asimilación de la dieta. Por otra parte, la imposibilidad de compensar su tasa metabólica asociado a la mayor temperatura en este hábitat, provocaría que las larvas están permanentemente sometidas a una demanda energética mayor por su mayor metabolismo estándar. Dado que en general, la capacidad de aumentar la ingesta de energía tiene límites impuestos por las capacidades físicas del sistema digestivo, es razonable suponer que esta permanente alza en el metabolismo tenga por consecuencia una menor inversión en biomasa, alcanzando la metamorfosis a tamaños menores. Sin embargo, las larvas provenientes de esta localidad alcanzan tamaños mayores a los de las larvas de otras localidades, tanto en terreno (Mendez, datos no publicados) como en condiciones de laboratorio. Esto indica que los individuos de esta población de alguna forma, manejan esta limitación

La respuesta a la interrogante de por qué las larvas de El Tatio metamorfosean a mayor tamaño, a pesar de habitar a mayor temperatura, cae en el campo de las conjeturas. En términos adaptativos, el balance energético presenta varios componentes susceptibles de ser acomodados a las particulares condiciones del ambiente, en función de aumentar el fitness de un organismo (Calow 1985). La población que habita en El Tatio no esta sujeta a la presión de alcanzar la metamorfosis antes de que el agua se congele durante el invierno, pues este evento no ocurre en las aguas termales a las que habitan, tanto las larvas como los adultos (Benavides, observación personal). Si ha

transcurrido un suficiente tiempo, puede haberse producido un cambio en los componentes adaptativos que determinan la estrategia de distribución de los recursos en el balance energético global, de manera que larvas provenientes de El Tatio presentan un tamaño mayor en busca de un mayor fitness (Sibly & Calow 1986). De esta forma, las larvas provenientes del El Tatio y otras localidades, enfrentadas a las mismas condiciones de temperatura y dieta, podrían presentar tamaños a la metamorfosis mayores, como reflejo de su particular estrategia de adecuación a sus ambientes particulares. Sin embargo, si alcanzar la metamorfosis a tamaños mayores representa o no una ventaja en *Bufo spinulosus*, requiere de mayor investigación de la historia natural de esta especie en sus diferentes hábitats.

En general, los estudios inter o intraespecíficos sobre la adaptación y aclimatación térmica que se han desarrollado en anuros han considerado el estudio de una población determinada junto con las características de su ambiente (ej. Alvares & Nicieza 2002). La posible variación geográfica en la expresión de atributos como el crecimiento y su relación con la temperatura sólo ha sido incorporada recientemente por Stahberg et al. (2001). En la presente tesis se ha intentado dilucidar cuán particular es la respuesta de una población de *Bufo spinulosus* que habita en un ambiente de características únicas, al comparar la respuesta a la temperatura de 5 poblaciones que abarcan un amplio rango de distribución geográfica de más de 2000 km de largo. Resulta evidente que de haber considerado sólo una la población para ser comparada con la de El Tatio, las conclusiones obtenidas habrían sido diferentes. Por ello, este estudio aporta una aproximación que ha incorporado en la comparación de atributos, como crecimiento, metabolismo y tamaño a

la metamorfosis, la variable procedencia geográfica, permitiendo entonces una análisis más integral de las variaciones observadas en estos atributos.

4.1 COMENTARIO FINAL

El ciclo de vida de los anfibios y sus relaciones con las variables abióticas y bióticas, presenta una imbricada trama de interacciones que hace dificultosa su interpretación. En la Figura 17 he intentado graficar el numeroso conjunto de variables que lo pueden afectar y los diferentes efectos que pueden tener las etapas que lo conforman descritos en la literatura. Lo más relevante del ciclo es que la historia de vida de los anfibios puede dividirse en dos etapas principales, que se llevan a cabo en condiciones radicalmente diferentes, las larvas son acuáticas y los juveniles y adultos son terrestres. Esta diferencia resulta relevante en cuanto a como pueden afectar cada etapa las mismas variables bióticas y abióticas. Así por ejemplo, las larvas acuáticas tienen una capacidad mucho más restringida en cuanto a la termoregulación conductual en comparación a la que pueden ejercer los adultos y juveniles. Por esto como resultado final, los atributos a estudiar en los adultos, son el resultado de una compleja sucesión de eventos y relaciones con el medio, a lo que se pueden sumar las diferencias genéticas que pueden existir entre los individuos de diferentes poblaciones. El establecer las relaciones de causa y efecto entre las diferentes relaciones descritas, para luego postular modelos que expliquen de manera global el conjunto de resultados empíricos y experimentales observados en anfibios, ha sido motivo de una importante cantidad de

investigación, entre otras razones, porque los anfibios resultan modelos experimentales apropiados y de relativamente fácil manipulación.

Mucha de la experimentación fisiológica ha tomado a la especie como unidad, no tomando en consideración la compleja red de relaciones resumida en la Figura 17. Este factor puede introducir importantes fuentes de variación, la que es necesario incorporar en las investigaciones relativas a los ciclos de vida y la dinámica de las historias de vida, en particular en aquellas especies que presentan rangos de distribución geográfica amplios, abarcando por tanto muchos hábitats diferentes. El uso de algunas especies como modelos sobre los cuales se extraen conclusiones, puede resultar en una simplificación que puede llevar a conclusiones no del todo aplicables a todas las especies, e incluso, a poblaciones distintas de una especie. En este sentido, explorar la validez de los modelos en diferentes especies puede resultar en un aporte importante en su validación o rechazo, por ello a pesar de lo general que puedan aparecer los modelos, ponerlos a prueba siempre será relevante.

Los modelos planteados para explicar el crecimiento y desarrollo en anfibios han reconocido la importancia de la temperatura en estos procesos, pero han atribuido al efecto de la temperatura sobre el crecimiento y desarrollo una importancia que ha dejado de lado otros aspectos relevantes de la historia de vida de los organismos, como puede ser su efecto sobre la capacidad de obtener la energía, o el efecto indirecto que puede tener la temperatura en la disponibilidad de ella a través de la cantidad y calidad de las dietas disponibles en cada hábitat.

La presente tesis intentó establecer si algunas de estas relaciones y modelos descritas para anfibios permitían explicar lo observado para *Bufo spinulosus*.

Las larvas de esta especie se comportan, en términos generales, de acuerdo a lo descrito en la literatura en relación con el efecto que puedan tener la densidad y la dieta sobre el tamaño alcanzado a la metamorfosis. Sin embargo, éstos parecen ser factores secundarios frente al efecto global que la temperatura ejerce sobre las tasas de desarrollo. Los patrones de crecimiento y tamaño alcanzado por las larvas resultan independientes de las oscilaciones térmicas que puedan sufrir las larvas, dependiendo mas bien del limite superior de la temperatura a la que están expuestas.

Teniendo presente entonces que el tamaño depende mas bien del limite superior de la temperatura del ambiente, y siendo este similar para las diferentes localidades estudiadas, debería esperarse que los individuos de esta especie provenientes de diferentes localidades presentaran tamaños a la metamorfosis similares al someterlos a un régimen de temperatura que se asemeja a las condiciones naturales a las que las larvas se enfrentan. Sin embargo, la localidad de origen de las larvas si ejerce una influencia sobre el desempeño de las larvas en iguales condiciones de temperatura, densidad y dietas, ya que las larvas de El Tatio alcanzan tamaños mayores. Esta deferencia no puede ser explicada por el efecto de la localidad sobre su metabolismo ni por su capacidad de simular los alimentos, ya que para estas variables la procedencia geográfica resulta irrelevante. Este resultado no concuerda con los modelos tradicionales planteados para los anfibios, haciendo necesario incorporar explicaciones alternativas. Las larvas de El Tatio parecen presentar una mejor adecuación biológica a las condiciones de permanente exposición a altas temperaturas y supresión de una etapa invernal, que impone un límite al período de desarrollo larval. Una aproximación a las historias de vida basada en el principio de asignación podría ayudar a explicar estos

resultados. Las larvas de *Bufo spinulosus* enfrentan en cada localidad condiciones que determinan la forma en como adquieren y asignan la energía entre los diferentes componentes de sus balances energéticos, uno de los cuales es el crecimiento. Un factor que aparece muy relevante es que, la población que habita en El Tatio, no tiene una restricción temporal para alcanzar la metamorfosis, las que si tienen otras poblaciones para las que la llegada del invierno representa un evento relevante, o en los casos de los hábitats donde la desaparición de las pozas y arroyuelos donde se verifica la metamorfosis, eventos que obligan a las larvas a salir del agua y buscar refugio en el ambiente terrestre. Frente a esta circunstancia tan particular, la población de El Tatio puede haber ajustado las asignaciones de energía dentro de sus presupuestos, logrando tamaños mayores, lo que pueden favorecer la sobrevivencia.

El que las larvas de El Tatio que habitan en ambientes permanentemente más cálidos metamorfoseen a tamaños mayores, no concuerda con los modelos planteados, pues según ellos predicen, estos juveniles deberían ser más pequeños, llamando la atención entonces sobre la influencia de las particulares condiciones en las que esta población de desarrolla. Esto es un claro indicio que los modelos sobresimplifican las relaciones y pueden resultar en algunos casos claramente inadecuados.

Otro aspecto que esta tesis ha permitido explorar es la relación entre el tamaño de los postmetamórficos y el de los adultos. Los adultos de la localidad de El Tatio son de menor tamaño que de otras localidades, a pesar de que los postmetamórficos son más grandes. Por lo tanto, la hipótesis de que el tamaño de las larvas determina el tamaño de los adultos puede ser descartada en este caso. La explicación de que los adultos de El Tatio sean más pequeños deberá buscarse en la etapa de vida terrestre de esta especie, en

la que será necesario poner nuevamente a prueba los modelos e hipótesis planteados. Dentro de las explicaciones posibles, resulta relevante considerar que, ha diferencia de la mayoría de las localidades donde habita *Bufo spinulosus*, en El Tatio los individuos adultos son mucho más acuáticos. Esto implica que su temperatura corporal es mas alta que la registrada en ejemplares de otras localidades (Benavides, observación personal). Este debiera ser el punto de partida de cualquier explicación sobre el tamaño corporal que los adultos de esta localidad finalmente alcanzan.

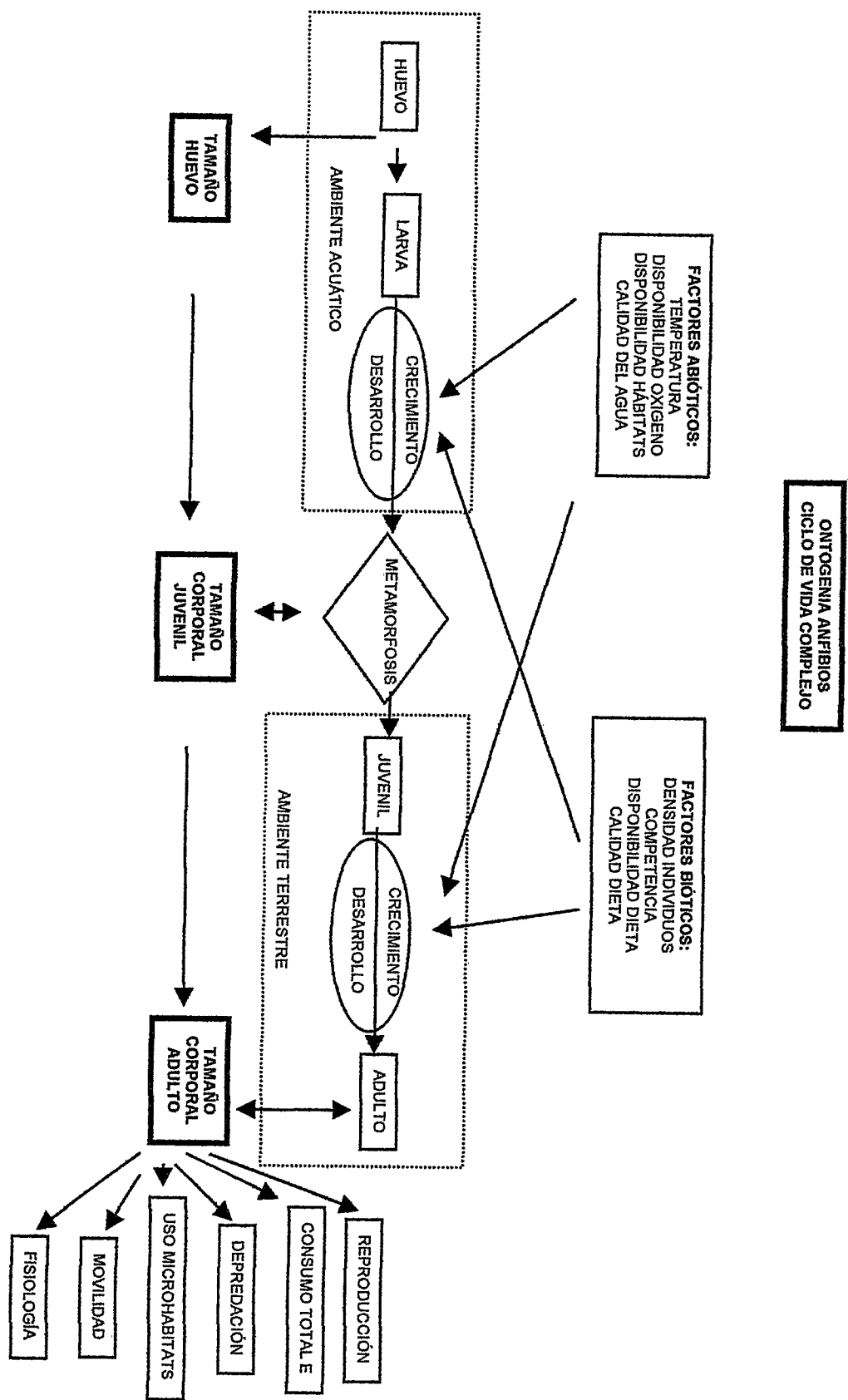


Figura 17 Esquema de las principales relaciones entre el ciclo de vida complejo planteado descrito para anfibios y su relación con factores bióticos y abióticos.

5 CONCLUSIONES

En relación con las hipótesis planteadas y los resultados experimentales obtenidos en la presente tesis, se puede concluir lo siguiente:

1. Las temperaturas máximas a las que están expuestas las larvas en las diferentes localidades no son distintas. La principal diferencia entre El Tatio y las demás localidades estudiadas estriba en que en este lugar no hay oscilación térmica diaria ni estacional, mientras que en las otras localidades si.
2. La temperatura aparece ser la variable más influyente en el crecimiento y tamaño que alcanzan la metamorfosis las larvas, ejerciendo su influencia a través de la modificación de la tasa de desarrollo. Bajo el efecto global de la temperatura, se ejercen los efectos de otros factores como la densidad y la dieta.
3. En las larvas de *Bufo spinulosus* no existe compensación al aumento de la temperatura, siendo la Tasa Metabólica permanentemente alta durante esta etapa de desarrollo. Por otra parte, el oxígeno disponible en la las diferentes localidades, no aparece limitante.
4. La temperatura ejerce un efecto positivo sobre la capacidad de asimilar los alimentos, efecto que es más notorio con una dieta pobre. Por otra parte, no existe influencia de la localidad de origen en cuanto a la capacidad de asimilar las dietas experimentales usadas.

5. Los tamaños a la metamorfosis que alcanzan las larvas de distintos orígenes geográficos resultan distintos, siendo las larvas de El Tatio las que alcanzan los mayores tamaños a la metamorfosis. Este resultado es valido tanto para un régimen constante de temperatura, como en uno variable en que la temperatura osciló entre 15 °C y 25 °C grados, situación que simula el régimen térmico para todas las otras localidades estudiadas.

6. El que los individuos adultos de la población del El Tatio presenten un tamaño corporal menor, comparado con otras poblaciones, no esta asociado a que en esta localidad se alcancen tamaños menores durante la metamorfosis. El que los adultos sean más pequeños en esta localidad, probablemente esta asociado a la vida más acuática que desarrollan, que tendría por consecuencia presentar una mayor y más constante temperatura corporal.

6 LITERATURA CITADA

- ALVAREZ D & G NICIEZA (2002) Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Funct Ecol* 16:640:648.
- ATKINSON D (1994) Temperature and organism size - A biological law for ectotherms? *Adv Ecol Res* 25: 1-58.
- ATKINSON D (1995) Information, non-genetic constrains, and the testing of theories of life-history variation. En: *Behavioral Ecology* (Sibly RM & Smith RH eds.). Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp.: 99-104.
- ATKINSON D (1996) Ectotherm life-history responses to developmental temperature. En: *Animals and Temperature, Phenotypic and Evolutionary Adaptation* (Johnston IA & Bennett AF, Eds.) Society for experimental Biology Seminar Series 59. pp.: 183-204.
- BECK CW (1997) Effect of changes in resource level on age and size at metamorphosis in *Hyla squirella*. *Oecol* 112:187-192.
- BENAVIDES AG, F BOZINOVIC, JM CANCINO & L YATES (1986) Asimilación de algas por dos peces del litoral chileno: *Sicyases sanguineus* (GOBIESOCIDAE) y *Aplodactylus punctatus* (APLODACTILIDAE). *Medio Ambiente (Chile)* 8:21-26.
- BERNARDO J & NL REAGAN-WALLIN (2002) Plethodontid salamanders do not conform to "general rules" for ectotherm life histories: insights from allocation models about why simple models do not make accurate predictions. *Oikos* 97:398-414.

- BERVEN KA (1990) Factors affecting population fluctuation in larval and adult stage of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology* 71: 1599-1608.
- BJORNDAL KA (1985) Use of ash an indigestible dietary marker. *Bull Mar Sci* 36:224-230
- BRADY LD & A GRIFFITHS (2000) Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*) *J Zool Lond* 252:61-69.
- CALOW P (1985) Adaptive aspects of energy allocation. En: *Fish Energetics New Perspectives* (P Tyler & P Calow Eds.) pp:13-32 Croom Helm ltd Kent
- CEI J (1962) *Batracios de Chile*. Ediciones Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- D'ANIELLO, G D'ONOFRIO, M PISCHETOLA & JM DENUCE (1989) Effect of pH, Salinity and Ca^{2+} , Mg^{+} , K^{+} and SO_4^{2+} ions on hatching and viability of *Loligo vulgaris* embryo. *Comp Biochem Physiol* 94A: 477-481.
- DAVENPORT J (1992) *Animal life at low temperature*. Chapman & Hall, London
- DENVER RJ (1997) Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Amer Zool* 37: 172-184.
- DUELLMAN WE & L TRUEB (1994) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- ELLIOT JM. (1972) Rates of gastric evacuation in brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwater Biol* 2:1-18.

- GIRISH S & SK SAIDAPUR (1999) The effects of kinship and density on growth and metamorphosis of the bronze frog (*Rana temporalis*) tadpoles. *Acta Ethol* 2:61-66.
- GREEN EJ & DE CARRIT (1967) New Tables for oxygen saturation in seawater. *J Mar Res* 25:140-147.
- GOSNER KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- HOCHACHKA PW & GN SOMERO (1984) *Biochemical adaptation* Princeton University Press, New York.
- KAM YC, CF YEN, HC CHEN, PY LIN, J WANG, & CT CHUI (2001) The thermal environment of arboreal pools and its effects on the metabolism of the arboreal, oophagus tadpoles of a Taiwanese tree frog, "*Chrizalus eiffingeri*" (Anura: Rhacophoridae). *Comp Biochem Physiol* 129A:519-525.
- KUPFERBERG SJ (1997) The role of larval diet in Anuran metamorphosis. *Amer Zool* 37: 146-159.
- LARSE LO (1992) Feeding and digestion. En: *Environmental Physiology of the Amphibians* (Feeder ME & WW Burggren Eds.). The University of Chicago Press, Chicago. pp.: 378-395.
- LAUGEN AT, A LAURILA & J MERILÄ (2003) Latitudinal and temperature-dependent variation in embryonic development and growth in *Rana temporaria*. *Oecol* 135: 548-554.

- LEIPS J & J TRAVIS (1994) Metamorphic responses to changing food levels in two species of Hylid Frogs. *Ecology*: 75:1345-1356.
- LOMAN J (2002) Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria*. *J Zool Lond* 258:115-129
- MATTSON WJ (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annu Rev Ecol Syst* 11: 119-161
- McINTYRE PB & SA McCOLLUM (2000) Responses of bullfrog tadpoles to hypoxia and predator. *Oecol* 125:301-308
- MONTGOMERY L & SD GERKING (1980) Marine macroalgae as foods for fishes: an evaluation of potential food quality. *Environ Biol Fishes* 5:143-153.
- MUHLHAUSER HA & L SOTO (1987) Improvement of the Kjeldahl Method for total nitrogen including Acid-Hydrolyzable Phosphorus determinations in freshwater ecosystems. *Intern J Environ Anal Chem* 28: 215-226.
- NAVAS CA (1996) Metabolic physiology, locomotion performance and thermal niche breadth in neotropical anurans. *Physiol Zool* 69: 1481-1501.
- NAVAS CA (1997) Thermal extremes at high elevations in the Andes: Physiological ecology of frogs. *J Thermal Biol* 22: 467-477
- NEVO E (1973) Adaptive variation in size of Cricket frogs. *Ecology*, 54:1271-1281;
- NEWMAN RA (1994) Genetic variation for phenotypic plasticity in the larval life history of spadefoot toads (*Scaphiopus couchii*). *Evolution* 48: 1773-1785.

- NEWMAN RA (1994a) Genetic variation for phenotypic plasticity in the larval life history of spadefoot toads (*Scaphiopus couchii*). *Evolution* 48: 1773-1785.
- NEWMAN RA (1998) Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level *Oecol* 115:9-16.
- NÚÑEZ H, MA LABRA & J YAÑEZ (1982) Hábitos alimentarios de dos poblaciones andinas de *Bufo spinulosus* Wiegmann, 1835 (Anura: Bufonidae). *Bol Mus Nac Hist Nat Chile* 39: 81-91.
- PETERS RH (1983) *The ecological implications of body size*. Cambridge University Press, Cambridge.
- PLENET S, A PAGANO, P JOLY & P FOUILLET (1998) Variation of plastic responses to oxygen availability within the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *J Evol Biol* 13: 20-28.
- PRIEDE IG (1985) Metabolic scope in fishes. En: *Fish Energetics new perspectives* (Tytler T & P Calow Eds.) Croom Helm, London pp.: 33-66.
- READING CJ & RT CLARKE (1999) Impacts of climate and density on the duration of the tadpole stage of the common toad *Bufo bufo*. *Oecol* 121:310-315
- ROME LC, ED STEVENS & HB JOHN-ALDER (1992) The influence on temperature and thermal acclimation on physiological function. En: *Environmental Physiology of the Amphibians* (Feeder ME & WW Burggren Eds.). The University of Chicago Press, Chicago, pp.: 183-205.121:310-315.

- ROSENMAN M (1978) La presión crítica de oxígeno. Arch Biol Med Exp 20: 75-78.
- ROSSITER M (1996) Incidence and consequences of inherited environmental effects. Annu Rev Ecol Syst 27:451-476
- RUIZ G, M ROSENMAN & A VELOSO (1987) Valores hematológicos y distribución altitudinal de anfibios chilenos. Arch Biol Med Exp 20: 79-84.
- RUIZ G, M ROSENMAN & A VELOSO (1989) Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. Comp Biochem Physiol 94A: 643-646.
- SCHMIDT-NIELSEN K (1997) Animal Physiology. Cambridge University Press.
- SEMLITSCH RD, DE SCOTT & HK PECHMANN (1988) Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambistoma talpideum* Ecology 69: 184-192. 94A: 643-646.
- SIBLY RM (1981) Strategies of digestion and defecation. En: Physiological Ecology: An evolutionary approach to resource use. (Townsend CR & Calow P, Eds.) Blackwell Scientific Publications, London. pp.: 109-139.
- SIBLY RM & D ATKINSON (1994) How rearing temperature affects optimal adult size in ectotherms. Funct Ecol 8: 486-493.
- SIBLY RM & P CALOW (1986) Physiological ecology of animals an evolutionary approach. Blackwell Scientific Publication, London.
- SINSCH U (1989) Behavioral thermoregulation of the Andean toad (*Bufo spinulosus*) at high altitudes. Oecol 80:32-38

- SOTO E (2003) Variación morfológica, variación genética y estructura poblacional en poblaciones de *Bufo spinulosus* (ANURA: BUFONIDAE) en Chile. Tesis para optar al grado de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- STAHLBERG F, M OLSSON & T ULLER (2001) Population divergence of developmental thermal optima in Swedish common frogs, *Rana temporaria* J Evol Biol 14:755-762
- TATTERSALL GJ & PA WRIGHT (1996) The effects of ambient pH on nitrogen excretion in early life stages of the American Toad (*Bufo americanus*) Comp Biochem Physiol 113A:369-374
- TRAVIS J & JC TREXLER (1986) Interactions among factors affecting growth, development and survival in experimental populations of *Bufo terrestris* (Anura: Bufonidae). Oecol 69:110-116.
- TWOMBLY S (1996) Timing of metamorphosis in a freshwater crustacean: son with anuran models. Ecology 77:1855-1866.
- VALENCIA J, A VELOSO & M SALABERRY (1982) Nicho trófico de las especies de herpetozoos del transecto Arca - Chungará En "El hombre y los ecosistemas de montaña". MAB 6. Santiago de Chile. pp.: 269-292.
- VAN VOORHIES WA (1996) Bergmann sizes clines: A simple explanation for their occurrence in ectotherms. Evolution, 50:1259-1264

- VELOSO A & J NAVARRO (1988) Lista sistemática y distribución geográfica de anfibios y reptiles de Chile. Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali Torino 6: 481-539.
- VELOSO A, M SALLABERRY, J NAVARRO, P ITURRA, J VALENCIA, M PENNA & N DIAZ (1982) Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. En "El hombre y los ecosistemas de montaña". MAB 6. Santiago de Chile. pp: 135-265.
- WARKENTIN KM (2002) Hatching timing, oxygen availability, and external gill regression in the Tree Frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiol Zool* 75:155-164.
- WILBURG HM & JP COLLINS (1973) Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182:1305-1314
- WILBURG H.M. (1980) Complex life cycles. *Annu Rev Ecol Syst* 11:67-93.
- WOLF JB, ED BRODIE, JM CHEVERUD, AJ MOORE & WADE MJ (1998) Evolutionary consequences of indirect genetic effects. *TREE* 13: 64-69.
- WOODS HA & JF HARRISON (2001) The beneficial acclimation hypothesis versus specific traits: Physiological change in water -stressed *Manuca sexta* Caterpillars. *Physiol Biochem Zool* 71:32-44.