

UCH-FC  
MAG-EBE  
M357  
C 1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Variación de atributos morfológicos y de historia de vida en *Rhinella spinulosa*: Aproximaciones naturales y de campo en sistemas de pozas temporales”**

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

Facultad de Ciencias

por

**Marcela Andrea Márquez García**

**Junio, 2009**

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



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

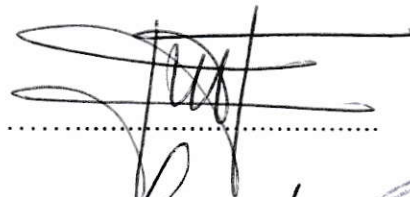
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

**MARCELA ANDREA MÁRQUEZ GARCÍA**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 26 de Mayo del 2009.

**Director de Tesis:**

Dr. Marco Méndez T.



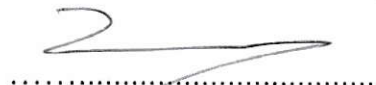
**Co-Director de Tesis:**

Dr. Michel Sallaberry A.



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Rodrigo Ramos J.



Dr. Ramiro Bustamante O.



*A una gran mujer, mi mamá*



## AGRADECIMIENTOS



En primer lugar agradezco a mis tutores: al Dr. Marco Méndez, por su infinita paciencia, guía y amistad, y al Dr. Michel Sallaberry por su apoyo y colaboración en terreno. Asimismo, quiero agradecer al Dr. Rodrigo Ramos y al Dr. Ramiro Bustamante por sus valiosos aportes al proyecto de tesis. Agradezco a la Municipalidad de Lo Barnechea por permitirnos trabajar en sus terrenos y brindarnos alojamiento cerca del sitio experimental, especialmente a Pablo Villoch y Gloria Muñoz. También quiero agradecer el apoyo financiero de la beca CONICYT y al Proyecto FONDECYT 1061256 por financiar esta tesis.

El arduo trabajo que implica llevar a cabo experimentos en condiciones naturales no hubiera sido posible sin la colaboración de muchos compañeros y amigos. De este modo, quiero agradecer especialmente a Rodrigo Pavez por su constante apoyo, ayuda, amistad y por sus ricos almuerzos, y a Marjorie Correa, además de su amistad y grata compañía en la montaña, por ser tan resolutiva y solucionar eficazmente los problemas que surgían día a día. Del mismo modo, agradezco a mis queridos compañeros de laboratorio: Javiera Cisternas y su fitness Facundo Saldivia, Hector Echeverría, Claudio Correa, Luis Pastenes, Paulina Jiménez, Carlos Pino y particularmente a Víctor Vidal y Jorge Kramer por dar continuidad a esta investigación. A mis amigos: Paola Henríquez, Virginia Donoso, Felipe Livert, Ignacio Montt, Catalina Ardiles y Mauricio Soler, por su compañía y ayuda. Con cariño agradezco a la gente de La Parva por su invaluable

colaboración y alegría: Juan Pablo Núñez, Don Pancho y familia, y a mi fiel ayudante Dieguito. Finalmente, quiero agradecer a mi familia, a mis padres, mi tía, mi hermana y Felipe por estar siempre conmigo y apoyar incondicionalmente esta aventura en la montaña.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	viii
Abstract.....	x
Capítulo I - Introducción general.....	1
Capítulo II – 1° artículo aceptado en <i>Evolutionary Ecology Research</i> .....	4
Capítulo III – 2° artículo en preparación.....	32
Capítulo IV – Discusión general.....	60
Capítulo V – Conclusiones.....	66
Literatura citada.....	67



## TABLAS

### 1° artículo aceptado en *Evolutionary Ecology Research*

Tabla 1.1. Características físicas de las pozas estudiadas.....	26
Tabla 1.2. Resultados del análisis de modelo mixto para el largo antero-posterior (SVL) y la edad a la metamorfosis.....	27
Tabla 1.3. Resultados del análisis multivariado (MANCOVA) y univariado (ANCOVA) de la covarianza para los rasgos morfológicos de los postmetamórficos.....	28

### 2° artículo en preparación

Tabla 2.1. Temperaturas medias, mínimas y máximas por nivel de desecación.....	56
--	----

### Discusión general

Tabla 3.1. Resumen de las principales preguntas y resultados de los dos artículos incluidos en la tesis.....	65
--	----



## FIGURAS

1° artículo aceptado en *Evolutionary Ecology Research*

Figura 1.1. Medidas morfométricas realizadas a los postmetamórficos.....	29
Figura 1.2. Tamaño corporal promedio a la metamorfosis (largo antero-posterior: SVL) para los tres niveles de desecación.....	30
Figura 1.3. Tiempo de desarrollo al estadio 42 y 46 de Gosner (éste último correspondiente a la metamorfosis) para los tres niveles de desecación.....	31

2° artículo en preparación

Figura 2.1. Red experimental de pozas artificiales.....	57
Figura 2.2. Distribución de las frecuencias de desarrollo en larvas provenientes del tratamiento con desecación alto y del tratamiento con desecación bajo.....	58
Figura 2.3. Tamaño promedio a la metamorfosis (largo antero-posterior: SVL) para los dos niveles de desecación .....	59





## RESUMEN

La variación de atributos morfológicos y de historia de vida del anuro *Rhinella spinulosa* en respuesta a la desecación de las pozas fue evaluada a través de aproximaciones naturales y manipulativas de campo. La primera aproximación consistió en monitorear un sistema de pozas naturales en la zona de Farellones, Cordillera de los Andes de Chile central, donde se midió la tasa de desarrollo, la edad y el tamaño a la metamorfosis, así como nueve rasgos morfológicos para los ejemplares postmetamórficos recolectados. Los resultados mostraron que las larvas provenientes del nivel de desecación alto y medio alcanzaron la metamorfosis a una menor edad y con un tamaño menor, en comparación con aquellas provenientes del nivel de desecación bajo. Asimismo, la desecación tuvo un efecto sobre el diámetro del ojo, la distancia narina boca y el largo de la extremidad posterior, siendo mayores en aquellos postmetamórficos provenientes del tratamiento de desecación bajo. En una segunda aproximación, se construyó un sistema de pozas artificiales con dos niveles de desecación, donde se midió el tiempo de desarrollo, el tamaño y la edad a la metamorfosis, así como el largo de la pata posterior en individuos provenientes de los dos tratamientos. Adicionalmente, se tomaron registros diarios de la temperatura del agua. Los resultados mostraron que las pozas con mayor desecación presentaron las temperaturas medias y máximas más altas. Las larvas provenientes de este tratamiento aceleraron el desarrollo, alcanzando la metamorfosis a una menor edad pero a un tamaño similar que las larvas provenientes del

nivel de desecación bajo. El largo de la extremidad posterior no varió entre los tratamientos. Las diferencias observadas entre ambos experimentos podrían ser explicadas por factores independientes a la desecación, como la densidad inicial de individuos y la calidad nutricional de la dieta, los que en conjunto contribuirían a determinar si la metamorfosis ocurre en un umbral de desarrollo o a un tamaño mayor. Los resultados de esta tesis sugieren que las restricciones temporales del hábitat inducen variación fenotípica en atributos morfológicos y de historia de vida en *Rhinella spinulosa*, plasticidad que juega un rol fundamental para esta especie en la zona central del país, ya que le permite enfrentar la desecación inminente de las pozas temporales.

## ABSTRACT

The morphological and life history traits variation of the anuran *Rhinella spinulosa* in response to pond drying was evaluated by natural and field approaches. The first approach consisted of monitoring a natural pond system in Farellones, Andes Range of central Chile, where development rate, age and size at metamorphosis were measured. Also, nine morphometric measurements were made on each collected toadlet. The results showed that tadpoles from ponds with high and medium desiccation levels reached metamorphosis at an earlier age and at a smaller size compared to individuals in the low desiccation level. Besides, pond drying had an effect on eye diameter, nose-mouth length and hind limb length, being larger in toadlets from low desiccation ponds. In a second approach, an artificial pond system was constructed with two desiccation levels where development time, age and size at metamorphosis as well as hind limb length were measured in collected toadlets. In addition to this, water temperature was recorded daily. Ponds with higher desiccation had the highest mean and maximum temperatures. Tadpoles from this treatment accelerated development reaching metamorphosis at an earlier age but at similar size as tadpoles from the low desiccation level. Hind limb length did not vary between treatments. The differences found between both experiments could be explained by factors independent to desiccation, such as initial tadpole density and nutritional quality of food, which altogether would contribute to determine if the metamorphosis occurs at a development threshold or at a bigger size.

The results of this thesis suggest that habitat time constraints promote phenotypic variation in morphological and life history traits in *Rhinella spinulosa*. This plasticity plays a fundamental role for this species in central Chile, because it allows it to face the imminent drying of the temporary ponds.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La plasticidad fenotípica se refiere generalmente a la variación fenotípica inducida por cambios ambientales (Stearns, 1989a). Los organismos con ciclos de vida complejos constituyen modelos excepcionalmente útiles e interesantes para evaluar el rol de la plasticidad fenotípica en la ecología y evolución de organismos que habitan en ambientes heterogéneos [ej. insectos (Bradshaw y Johnson, 1995; Gotthard, 1998), crustáceos (Hentschel y Emler, 2000), peces (Reznick, 1990) y anfibios (Rowe y Ludwig, 1991; Morey y Reznick, 2004; Rudolf y Rodel, 2007)]. Las pozas temporales, donde se reproducen los anfibios, son ejemplos clásicos de ambientes heterogéneos y resultan sistemas excelentes para el estudio de la plasticidad fenotípica en este grupo de animales (Newman, 1992). En estos sistemas, el que las larvas realicen la transición desde el hábitat acuático al terrestre a un tamaño y tiempo adecuados es crucial para su sobrevivencia, por lo que dichas variables son componentes claves de la adecuación biológica (Rowe y Ludwig, 1991; Roff, 1992; Altwegg y Reyer, 2003; Johansson *et al.*, 2005).

Modelos recientes han incorporado la influencia de las restricciones de tiempo (ej. duración del hábitat y estacionalidad) en el desarrollo larval y consecuentemente, en el tamaño y edad a la metamorfosis (Rowe y Ludwig, 1991; Abrams *et al.*, 1996; Rudolf y Rodel, 2007). Generalmente, se ha reportado que cuando el riesgo de mortalidad en el ambiente larval se incrementa en función del tiempo, los organismos aceleran su

desarrollo con el objeto de alcanzar la metamorfosis en menos tiempo, pero con el costo de hacerlo a un tamaño menor (Newman, 1988, 1989; Laurila y Kujasalo, 1999; Merilä *et al.*, 2000; Laurila *et al.*, 2002; Loman y Claesson, 2003). Asimismo, el ambiente puede inducir variaciones morfométricas afectando las tasas de crecimiento y de diferenciación (Blouin y Brown, 2000). En este sentido, se ha documentado que los organismos que aceleran el desarrollo producto de la desecación, presentan tibio-fibulas más cortas y son capaces de saltar menos que aquellos individuos que retrasan la metamorfosis (ej. Ficetola y De Bernardi, 2006; Richter-Boix *et al.*, 2006).

Si bien existen numerosos trabajos al respecto, que documentan la plasticidad de atributos morfológicos y de historia de vida en respuesta a la desecación de las pozas (ej. Newman, 1992; Denver, 1997; Denver *et al.*, 1998; Richter-Boix *et al.*, 2006), éstos se han llevado a cabo principalmente en condiciones de laboratorio, siendo menos frecuentes los estudios realizados en condiciones de terreno (ej. Newman, 1989; Tejedo y Reques, 1994; Loman, 2002; Morey y Reznick, 2004). La presente tesis tiene por objetivo evaluar la variación de atributos morfológicos y de historia de vida en el anuro *Rhinella spinulosa*, en función de distintos niveles de desecación, a través de aproximaciones naturales y manipulativas de campo. La ventaja de estas aproximaciones es que presentan un mayor grado de realismo en comparación a los experimentos de laboratorio, por cuanto se trabaja en condiciones naturales, y además permiten incorporar un mayor rango de manipulaciones experimentales y trabajar a una escala espacial mayor (Diamond, 1986).

*Rhinella spinulosa* es una especie que en Chile central se reproduce en pozas temporales de distinta duración y donde las mortalidades por desecación son eventos

muy comunes. Se propone como hipótesis que las restricciones temporales del hábitat larval (deseccación) promueven la variación de atributos morfológicos y de historia de vida en *R. spinulosa*.

A continuación se presentan dos manuscritos que comprenden los resultados de esta tesis. El primer manuscrito, aceptado en la revista *Evolutionary Ecology Research*, expone los resultados de un experimento natural, en el cual se evaluó la variación de atributos morfológicos y de historia de vida en *Rhinella spinulosa*, en respuesta a la desecación de las pozas. En este trabajo se monitoreó un sistema de pozas naturales en la zona de Farellones, Cordillera de los Andes de Chile central, donde se midió la tasa de desarrollo, la edad y el tamaño a la metamorfosis, así como nueve rasgos morfológicos para los ejemplares postmetamórficos recolectados. El segundo manuscrito en preparación, expone los resultados de un experimento manipulativo de campo, en el cual se exploró la respuesta de las larvas a la desecación del hábitat. En este experimento se construyó un sistema de pozas artificiales con dos niveles de desecación en un sector de La Parva, Cordillera de los Andes de Chile central, y se midió la tasa de desarrollo, la edad y el tamaño a la metamorfosis, junto con el largo de la extremidad posterior, en individuos postmetamórficos de la especie modelo.

Running Head: Pond drying effects on post-metamorphic *Rhinella spinulosa*

**EFFECTS OF POND DRYING ON MORPHOLOGICAL AND LIFE HISTORY  
TRAITS IN THE ANURAN *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae)**

M. Márquez-García<sup>1</sup>, M. Correa-Solis<sup>1</sup>, M. Sallaberry<sup>2</sup> and M.A. Méndez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Evolución, INTA, Universidad de Chile. Casilla 138-11,  
Santiago, Chile

<sup>2</sup>Laboratorio de Zoología de Vertebrados, Departamento de Ciencias Ecológicas,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago, Chile.

\* author to whom all correspondence should be addressed. e-mail: [mmendez@inta.cl](mailto:mmendez@inta.cl)



## ABSTRACT

**Question:** How does the duration of temporary ponds affect the morphological attributes and life history traits of post-metamorphic amphibians?

**Organism:** The anuran *Rhinella spinulosa* of the Andes Range of central Chile. This species reproduces in temporary and permanent ponds and is subject to different desiccation regimes.

**Time and Place:** Between October, 2006 and January, 2007 near Farellones (33°20'S, 70°18'W; 2331 m).

**Methods:** A natural experiment in ponds with three desiccation levels: (1) high, (2) medium and (3) low. We measured life history traits (development rate, metamorph size and time to metamorphosis) in 252 individuals collected from all desiccation levels. Nine morphometric measurements were made on each collected toadlet.

**Results:** Tadpoles from ponds with high and medium desiccation levels reached metamorphosis at an earlier age and at a smaller size compared to individuals in the low desiccation level. Post-metamorphic individuals from ponds with a low desiccation level also had longer hind limbs and larger values for head measurements.

**Conclusions:** These results suggest that in *Rhinella spinulosa* environmental heterogeneity promotes phenotypic variation in both morphology and life history traits.

*Keywords:* pond desiccation, hydroperiod, development time, metamorphosis size, *Rhinella spinulosa*, natural experiment.

## INTRODUCTION

Theoretical models indicate that the degree of environmental heterogeneity is a major factor regulating the evolution of phenotypic plasticity (Moran, 1992; Sultan and Spencer, 2002). In spatially or temporally variable environments, natural selection may favor either a suite of specialized genotypes with fixed phenotypes, each adapted to a particular environment, or flexible genotypes that express different phenotypes in different environments, obtaining higher fitness over a range of environments (Via and Lande, 1985; Futuyma and Moreno, 1988; Whitlock, 1996). Thus, environmental heterogeneity provides a scenario for adaptation (Bradshaw, 1965; Levins, 1968; Schlichting and Pigliucci, 1998).

Temporary ponds are classic examples of heterogeneous environments and excellent systems for the study of phenotypic plasticity in amphibians (Newman, 1992). In these systems making the transition from an aquatic to a terrestrial habitat at the right size and time is crucial for survival. Therefore life history traits such as larval growth rate, metamorph size and time to metamorphosis are important fitness components (Semlitsch, 2002 for references; Altwegg and Reyer, 2003; Johansson *et al.*, 2005). Recent models consider the influence of time constraints (e.g. habitat duration and seasonality) on development time and, consequently, on the optimal size and age at metamorphosis (Rowe and Ludwig, 1991; Abrams *et al.*, 1996; Rudolf and Rodel, 2007). When risk of mortality in the larval environment increases as a function of time, a younger age at metamorphosis may be favored in spite of costs associated with a smaller body size (Newman, 1988, 1989; Laurila and Kujasalo, 1999; Merilä *et al.*, 2000; Laurila *et al.*, 2002; Loman and Claesson, 2003; Rudolf and Rodel, 2007).

On the other hand, the plasticity of morphological attributes in relation to pond desiccation has been little explored in the literature, except for a few recent papers. Richter-Boix *et al.* (2006) evaluated the effect of pond desiccation on life history traits and the morphology of tadpoles and toadlets in *Pelodytes punctatus*. They found that tadpoles subjected to drying treatment accelerated metamorphosis and reached this stage with a lower body mass. Furthermore, post-metamorphic individuals in the drying treatment showed shorter and less muscular hind limbs, and reduced jump performance compared with individuals in the constant water treatment. Similarly, Newman (1989) reported that post-metamorphic individuals of *Scaphiopus couchii* had shorter hind limbs compared to individuals from less ephemeral habitats.

There is evidence of the effects of pond desiccation on life history traits and morphology in different amphibian species. However, most of this evidence originates from experimental laboratory studies using vertical-sided containers (e.g. Semlitsch, 1987; Wilbur, 1987; Semlitsch and Reyer, 1992; Row and Dunson, 1995; Denver *et al.*, 1998). The disadvantage of these experiments is that the reduction in water volume is not accompanied by a recession of the shoreline, as occurs in natural ponds. Brady and Griffiths (2000) studied tadpole development simulating desiccation in both conditions and they found that tadpoles metamorphosed at a smaller size and had slower development in shoreline ponds. Therefore it is interesting to evaluate these responses in natural conditions incorporating the effects of pond topography.

In this study we evaluated morphological and life history trait variation in toadlets of the anuran *Rhinella spinulosa*, in a natural desiccation experiment. Specifically, we monitored a pond system in the Andes mountain range of central Chile. This zone

provides an excellent opportunity to study the larval development of *R. spinulosa* as a function of different desiccation regimes. In post-metamorphic individuals we measured development rate, metamorph size and time to metamorphosis, as well as nine morphological measures.

We propose that pond duration will affect the life history traits of tadpole and toadlet morphology. Therefore, we predict that development rate and time to metamorphosis will change as a function of time constraints associated with pond duration. Also, we predict that toadlets from ponds with low desiccation levels will present a larger size at metamorphosis and longer hind limbs compared to individuals in ponds with higher desiccation levels.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

From October 2006 to January 2007 we conducted weekly sampling at a site located at Farellones, in the Andes Range of Chile's Metropolitan Region (33°20'48.3''S; 70°18' 51.2''W, altitude: 2331 masl). This area is characterized by a warm temperate climate, with winter snow and a dry season of four to five months. The mean annual temperature is 8.8°C and the annual precipitation is 615 mm (Luebert and Pliscoff, 2006). At the beginning of the dry season (September-October) the temperature increase melts the snow, flooding plain lands and creating pools, simultaneously. These systems are continuously filled by streams and are usually dry before the season ends (M. Méndez, personal observation). At the study site we identified ten ponds of different sizes, in which we followed egg masses of *Rhinella spinulosa* laid in October 2006. We left one clutch of eggs in each pond; the other egg masses were transferred to pools that were not part of the experiment. We selected clutches of similar size and developmental stages. At the moment the experiment began all clutches were of Gosner 15-16.

Since the selected ponds were of different shapes and had irregular depths, we did not consider these measures for comparison. Rather, as a comparative measure we used the maximum diameter of ponds (i.e. at the beginning of the experiment), which ranged from 1.9 to 14 m (see Table 1.1). As a proxy for the desiccation level of the pools we estimated hydroperiod (i.e. the length of time that the pond holds water and therefore provides aquatic habitat for tadpoles). This criterion was based on the fact that all ponds were produced at the same time, and that we observed the simultaneous laying of egg

masses after ponds were formed. A summary of the physical attributes of each pond is provided in Table 1.1.

### **Experimental procedure**

During the experiment we made weekly collections of five tadpoles and 10 to 15 post-metamorphic individuals. All individuals were anesthetized with MS222 (tricaine methanesulfonate) prior to being fixed in 70% ethanol. We made weekly temperature measurements from November to January, every hour between 11:00 and 18:00 hours, with a WTW digital thermometer.

While previous studies have shown that predators have a strong impact on life history traits and larval morphology (Skelly and Werner, 1990; McCollum and Leimberger, 1997; Van Buskirk and Schmidt, 2000; Relyea, 2002), we did not observe vertebrate (birds) or invertebrate predators (odonate larvae) in the study area during the experimental period. Since we have been following this pond system during eight years, and we have never observed birds eating larvae, we discard the possible effect of this kind of predator in our experimental area.

### **Development and time to metamorphosis**

The developmental stage of each collected larva was determined using Gosner's table (1960). Since we know the date on which the egg masses were laid (October 16, 2006), we estimated the age in days to reach: a) the stage at which toes 4-5 began to separate (Gosner stage 35); b) the stage at which the first forelimb emerged (Gosner stage 42); and c) the stage when the tail was completely reabsorbed (Gosner stage 46, complete metamorphosis).

## **Morphological measurements in toadlets**

We evaluated variation of external morphology in 252 toadlets from the studied ponds. The following morphological traits were measured: snout-vent length (SVL), head width, head height, mandible width, nose-mouth length, distance between nostrils, eye diameter, interorbital width, forelimb length and hind limb length (Figure 1.1). We included head measurements since it has been documented that larval development affects the rhythm and sequence of cranial ossification in anurans (Smirnov, 1992). Also, Emerson (1986) and Wassersug and Hoff (1982) found that the hormones, which control metamorphosis also control limb and skull development in anurans. Additionally, Lutz and Rome (1994) suggested that some larval environments, such as high larval density, induce allometry in the muscular structure of the hind limbs. So there is evidence to suspect that the relative head and limb sizes at metamorphosis are sensitive to development time as a function of desiccation risk. Measurements were made using a dissecting microscope with an incorporated micrometric ocular (0.1 mm precision).

## **Statistical analyses**

*Size and age at metamorphosis.* We used a linear mixed-model approach with hydroperiod length (in days), the pond area as continuous variable and pond number as categorical variable. Since we detected convergence in size and age at metamorphosis, data were transformed to  $\log_{10}$ , after which no convergence was detected. These analyses showed that only hydroperiod had an effect on size and age at metamorphosis (Table 1.2). Accordingly we did not use pond number and the pond area in posterior analyses. In a second statistical approach we performed the analysis using only

hydroperiod. This variable was categorized in tercile, classifying the ponds into three desiccation levels: high, medium and low (Table 1.1). To compare the age of tadpoles at Gosner stages 35 and 42, and age at metamorphosis (Gosner stage 46) at different desiccation levels we used Kruskal-Wallis tests. To evaluate the treatment effect on snout-vent length (SVL) we used one-way analysis of variance (ANOVA). In this analysis we used  $\log_{10}$  transformation of the data in order to meet the assumptions of normality and homocedasticity. The relationship between hydroperiod and snout-vent length was evaluated using regression analysis.

*Morphological variation.* Variation in morphological attributes was determined by a multivariate analysis of covariance (MANCOVA), using SVL as a covariate, followed by univariate analyses for each trait. All assumptions of MANCOVA were satisfied (i.e. normality, homoscedasticity and parallelism).

All statistical analyses were performed using the software STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2001) and SAS (Littell *et al.*, 1996).



## RESULTS

### Size at metamorphosis

Desiccation level had a significant effect on size at metamorphosis (ANOVA,  $F_{2,249} = 28.7$ ,  $P = 0.001$ ). Toadlets from low desiccation ponds had longer periods of larval development and larger sizes at metamorphosis (SVL) compared to toadlets that experienced a shorter hydroperiod. *A posteriori* comparisons (Bonferroni test) indicated no significant difference between high and medium desiccation levels, but both of these differed significantly with individuals from the low desiccation level. Thus, the low desiccation treatment had a large effect on the SVL of measured toadlets (Figure 1.2). Additionally, regression analysis comparing size at metamorphosis and hydroperiod showed a significant, positive association ( $r = 0.186$ ,  $F_{1,250} = 57.61$ ,  $P = 0.001$ ).

Field observations in the same population with marked toadlets show that individuals tend to settle in their pond after metamorphosis for three days (V. Vidal, personal communication). Since tadpoles were close to the metamorphosis, we visited the experimental area three times a week, and are certain that the collected individuals belong to the pond where they were collected.

### Development and age at metamorphosis

We observed high homogeneity in development rate within each pond, being remarkably synchronous both within ponds and among desiccation treatments. The age of tadpoles at Gosner stage 35 was greater at low desiccation levels, however this difference was not statistically significant ( $H = 3.908$ ,  $P = 0.1417$ ; Kruskal-Wallis test). At Gosner stages 42 and 46 (metamorphosis) the mean age increased as desiccation level

decreased (Figure 1.3) ( $H = 9.959$ ,  $P = 0.007$  and  $H = 28.366$ ,  $P = 0.001$ ; Kruskal Wallis tests for Gosner stages 42 and 46, respectively).

### **Morphology of post-metamorphic individuals**

Multivariate analysis of morphological variables showed significant differences as a function of desiccation level (MANCOVA,  $\lambda = 0.8465$ ;  $F_{18,480} = 2.3164$ ,  $P = 0.001$ ). The univariate analyses and *a posteriori* comparisons (Bonferroni test) indicated that eye diameter, mouth-nose distance and hind leg length were all greater in individuals from the low desiccation level. There was no significant difference between medium and high desiccation levels (Table 1.3).

## DISCUSSION

The temporary reduction of water volume in natural systems triggers a suite of environmental changes, such as an increase in water temperature (Newman, 1989), an increase in larval density and changes in the concentrations of solutes (Denver, 1997). It has been documented that ephemeral and permanent ponds in the same region have similar mean temperatures (Semlitsch and Wilbur, 1988; Newman, 1989; Morey and Reznick, 2004). In our experiment no significant differences among desiccation levels were found in mean temperature or daily temperature fluctuations. Thus, it appears that the effect of temperature in our experiment was not a relevant factor for the studied attributes.

Our data show that tadpole development time was influenced by hydroperiod (Table 1.2). Although the time to development at Gosner stage 35 did not vary among the three desiccation levels, the mean age at Gosner stages 42 and 46 was lower in ponds with high desiccation levels. This may be due to an acceleration of development during the last larval stages (see Newman, 1992), when tadpoles probably detect specific cues associated with desiccation. Although these specific cues are still unknown, a potential candidate is water chemistry. Morey and Reznick (2004) found that concentrations of ammonium nitrogen and calcium carbonate hardness tended to increase as larvae developed and ponds dried. Increases in hardness are probably a simple consequence of drying. Increases in the concentration of ammonia are caused by excretions of tadpoles. The increases that they observed were more pronounced in the cases where drying was most extreme. Thus, it is possible that these changes represent chemical cues related to the imminent drying of the larval habitat. This is a plausible explanation for our case,

especially given that we detected differences in larval development as a function of hydroperiod.

With respect to size at metamorphosis, our results indicate that there is a significant relationship between SVL and hydroperiod. Although the mixed model showed marginally significant values ( $P = 0.052$ ; Table 1.2), regression analysis showed a significant relationship. Also, our data showed that post-metamorphic individuals from low desiccation ponds had larger body sizes (SVL). According to Morey (1998), larvae that inhabit longer-lived ponds develop more slowly, which delays metamorphosis, resulting in larger body size. This difference was only found between the lowest desiccation level and the other two levels, suggesting that the development threshold of metamorphosis (defined by Day and Rowe (2002) as the minimum size that must be reached before the life-history transition can occur) was passed in this treatment, resulting in a substantial daily increase in size (Lind *et al.*, 2008). In spite of this, the variation in size at metamorphosis among ponds with different desiccation levels may be the result of multiple factors. One of the factors that were not evaluated in our study corresponds to egg size, which has been identified as a significant source of variation in hatchling, metamorphic and even adult traits in amphibians (Kaplan, 1998) and other organisms (reviewed in Mousseau and Fox, 1998). In our experiment it was not possible to measure this trait at the beginning of the experiment, because the clutches were in Gosner stage 15-16, which could introduce a bias in the interpretation of our results. However, we measured egg size in other clutches from Farellones and they showed a narrow range of variation for this population ( $2.08 \pm 0.017$  mm;  $n=157$  eggs, 12

clutches). Thus, if there was an effect mediated by egg size, we expect that it was similar in all of the clutches evaluated.

According to Loman (2002), the most important factor that affects the variation of size at metamorphosis is probably competition, which varies as a function of larval density. The field methodology used in our study does not allow us to establish precisely which factor is responsible for the positive relationship between hydroperiod and body size (e.g., density and/or competition). However, in a laboratory experiment performed in *R. spinulosa* we observed that there were only differences in size at metamorphosis at low densities of 5 to 15 ind/600 ml, while for densities of 30 to 45 ind/600 ml there were no differences (M. Méndez unpublished data). Thus, because we did not observe such low densities (5 or 15 ind/600 ml) in our natural experiment, we suggest that hydroperiod had a major effect in the observed size at metamorphosis.

In terms of possible allometric changes associated with desiccation, our results show that desiccation had an effect on eye diameter, nose-mouth length and hind limb length, whereas no differences were detected in the other characters evaluated. These morphological traits varied independently of body size, and were larger in toadlets from low desiccation ponds. It has been documented that head width and leg length are functionally important traits in anurans (Emerson, 1978, 1985; Duellman and Trueb, 1986), and that differences in growth rate may produce changes in these characters (Emerson, 1986; Newman, 1989; Blouin and Brown, 2000). Therefore, the allometric relationship between shape and size is not constant, but rather is a function of development rate (Blouin and Loeb, 1991). Thus, environment might induce morphometric variation simply by controlling the overall rates of growth and

differentiation (Blouin and Brown, 2000). Our data provide relevant information, since they show that allometry would exist as a function of desiccation in hind limb length and two head characters (eye diameter and nose-mouth length). For the salamander *Hynobius retardatus*, Kohmatsu *et al.* (2001) found lower head width at low density, both under laboratory and field conditions. The authors associated this difference with density-dependent effects (for insects see also Imasheva and Bublik, 2003). Our data show a similar pattern of variation as a function of desiccation. Larger values of eye diameter and mouth-nose distance were found in environments with low desiccation. Also we found longer hind limbs in environments with low desiccation, apparently related to the extension of larval period. Blouin and Brown (2000) described a similar variation pattern in *Rana cascadae*, but as a function of temperature. In their study, tadpoles with a longer larval period (lower temperature) had a longer tibia-fibula length, showing plasticity in this trait independent of body size.

There are a number of questions regarding the costs associated with plasticity in time and size at metamorphosis, as well as about the allometric variation of post-metamorphic individuals. For amphibians it has been proposed that size at metamorphosis is a life history trait directly related to survival in the first year of terrestrial life, and implies benefits in terms of fitness (Berven, 1990; Altwegg and Reyer, 2003; Gray and Smith, 2005). Thus, there appears to be a trade-off between size at metamorphosis and development time in amphibians that inhabit variable habitats (Abrams *et al.*, 1996). A positive correlation between size at metamorphosis and locomotor performance has been documented (Goater *et al.*, 1993; Beck and Congdon, 2000; Stevens *et al.*, 2004). Also, water loss during post-metamorphic life is directly

related to body size (Newman and Dunham, 1994). Therefore, early metamorphosed individuals (from ponds with high desiccation rates) who have smaller sizes and shorter legs would have lower survival probabilities. Although, we do not have data in our experiment related to postmetamorphic fitness, lower survival in early metamorphosed individuals would be a possible scenario for our species, which lives and moves in a dry mountain environment with high solar radiation, with annual Andean vegetation that dries in summer and has complete snow coverage during the winter.

Although natural experiments provide a high degree of realism, they do not permit the regulation of independent variables which might confound the causes of the observed responses (Diamond, 1986). Therefore, the present study cannot evaluate the effect of desiccation *per se* in the variation of tadpole and toadlet traits. We only evaluate the effect of desiccation in the context of all of the changes that it implies. We consider that to precisely determine the effects of desiccation it will be necessary to measure other variables correlated with the decrease in water volume in natural conditions (e.g. chemistry), as well as to perform laboratory (common garden) experiments that allow manipulation and control of these variables. This approach will allow us to evaluate the effects associated with delaying or accelerating metamorphosis on toadlet performance. Our group is currently studying this type of question using a combination of laboratory and field experiments.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Paula Neill, Claudio Correa, Javiera Cisternas and Paulina Jiménez for their constructive comments on a previous version of the manuscript. We thank Rodrigo Pavez, Alberto Veloso and Luis Pastenes for their cooperation in the field. We thank Barbara Leyton for her valuable help in statistical analysis. This contribution was financed by FONDECYT Project 1061256. M. Márquez-García thanks CONICYT for financial support. SAG (Servicio Agrícola Ganadero) supplied collecting permits (Resolution number 3085/2000, 2105/2004 and 13/2006).



## REFERENCES

- Abrams, P.A., Leimar, O., Nylin, S. and Wiklund, C. 1996. The effect of flexible growth rates on optimal sizes and development times in a seasonal environment. *American Naturalist*, **147**: 381-395.
- Altwegg, R. and Reyer, H.U. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, **57**: 872-882.
- Beck, C.W. and Congdon, J.D. 2000. Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toads, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Functional Ecology*, **14**:32-38.
- Berven, K.A. 1990. Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology*, **71**: 1599-1608.
- Blouin, M.S. and Loeb, M.L.G. 1991. Effects of environmentally induced development-rate variation on head and limb morphology in the green tree frog, *Hyla cinerea*. *American Naturalist*, **138**: 717-728.
- Blouin, M.S. and Brown, S.T. 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, **125**: 358-361.
- Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv. Genet.*, **13**: 115-155.
- Brady, L.D. and Griffiths, R.A. 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *J. Zool., Lond.*, **252**: 61-69.
- Day, T. and Rowe, L. 2002. Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life-history transitions. *American Naturalist*, **159**: 338-350.
- Denver, R.J. 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Am. Zool.*, **37**: 172-184.
- Denver, R.J., Mirhadi, N. and Phillips, M. 1998. An experimental analysis of adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: developmental response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology*, **79**: 1859-1872.
- Diamond, J. 1986. Overview: laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. In *Community Ecology* (J. Diamond and T.J. Case, eds.), pp. 3-22. New York: Harper & Row Publishers.

- Duellman, W. and Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill.
- Emerson, S.B. 1978. Allometry and jumping in frogs: helping the twain to meet. *Evolution*, **32**: 551-564.
- Emerson, S.B. 1985. Skull shape in frogs – correlations with diet. *Herpetologica*, **41**: 177-188.
- Emerson, S.B. 1986. Heterochrony and frogs: the relationship of a life history trait to morphological form. *American Naturalist*, **127**: 167-183.
- Futuyma, D.J. and Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **19**: 207-233.
- Goater, C.P., Semlitsch, R.D. and Bernasconi, M.V. 1993. Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. *Oikos*, **66**: 129-136.
- Gosner, N. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- Gray, M.J. and Smith, L.M. 2005. Influence of land use on postmetamorphic body size of Playa Lake amphibians. *Journal of wildlife management*, **69**: 515-524.
- Imasheva, A.G. and Bublik, O.A. 2003. Quantitative variation of four morphological traits in *Drosophila melanogaster* under larval crowding. *Hereditas*, **138**: 193-199.
- Johansson, F., Hjelm, J. and Giles, B.E. 2005. Life history and morphology of *Rana temporaria* in response to pool permanence. *Evolutionary Ecology Research*, **7**: 1025-1038.
- Kaplan, R.H. 1998. Maternal effects, developmental plasticity, and life history evolution. In *Maternal effects as adaptations* (T.E. Mousseau and C.W Fox, eds.), pp. 244–260. New York: Oxford University Press.
- Kohmatsu, Y., Shigeru, N. and Yamamura, N. 2001. Effects of head shape variation on growth, metamorphosis and survivorship in larval salamanders (*Hynobius retardatus*). *Ecological Research*, **16**: 73-83.
- Laurila, A. and Kujasalo, J. 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J. Anim. Ecol.*, **68**: 1123-1132.
- Laurila, A., Karttunen, S. and Merilä, J. 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution*, **56**: 617-627.

- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press.
- Lind, M.I., Persbo, F. and Johansson, F. 2008. Pool desiccation and developmental thresholds in the common frog, *Rana temporaria*. *Proc. R. Soc. B.*, **275**: 1073-1080.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W. and Wolfinger, R.D. 1996. SAS system for mixed models. Cary, NC: SAS Institute.
- Loman, J. 2002. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *J. Zool., Lond.*, **258**: 115-129.
- Loman, J. and Claesson, D. 2003. Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: a test of cost models. *Evolutionary Ecology Research*, **5**: 179-194.
- Luebert, F. and Plischoff, P. 2006. *Sinopsis Bioclimática y Vegetacional de Chile*. Santiago, Chile: Editorial Universitaria.
- Lutz, G.J. and Rome, L.C. 1994. Built for jumping: the design of the frog muscular system. *Science*, **263**: 370-372.
- McCollum, S.A. and Leimberger, J.D. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia*, **109**: 615-621.
- Merilä, J., Laurila, A., Pakkala, M., Räsänen, K. and Timenes Laugen, A. 2000. Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Ecoscience*, **7**: 18-24.
- Moran, N.A. 1992. The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *American Naturalist*, **139**: 971-989.
- Morey, S.R. 1998. Pool duration influences age and body mass at metamorphosis in the western spadefoot toad: implications for vernal pool conservation. In *Ecology, Conservation, and Management of Vernal Pool Ecosystems – Proceedings from a 1996 Conference* (C.W. Witham, E.T. Bauder, D. Belk, W.R. Ferren Jr. and R. Ornduff, eds.), pp. 86-91. Sacramento: California Native Plant Society.
- Morey, S.R. and Reznick, D.N. 2004. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos*, **104**: 172-190.
- Mousseau, T.A. and Fox, C.W. 1998. *Maternal Effects as Adaptations*. New York: Oxford University Press.

- Newman, R.A. 1988. Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution*, **42**: 774-783.
- Newman, R.A. 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, **70**: 1775-1787.
- Newman, R.A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: what type of phenotypic variation is adaptive, and what are the costs of such plasticity. *BioScience*, **42**: 671-678.
- Newman, R.A. and Dunham, A.E. 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia*, **1994**: 372-381.
- Relyea, R.A. 2002. Local population differences in phenotypic plasticity: predator induced changes in wood frog tadpoles. *Ecol. Monogr.*, **72**: 77-93.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. and Montori, A. 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research*, **8**: 309-320.
- Row, C.L. and Dunson, W.A. 1995. Impacts of hydroperiod on growth and survival of larval amphibians in temporary ponds of Central Pennsylvania, USA. *Oecologia*, **102**: 397-403.
- Rowe, L. and Ludwig, D. 1991. Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology*, **72**: 413-427.
- Rudolf, V.H.W and Rodel, M.O. 2007. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under certain time constraints. *Evolutionary Ecology*, **21**: 121-142.
- Schlichting, C.D. and Pigliucci, M. 1998. *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Semlitsch, R.D. 1987. Paedomorphosis in *Ambystoma talpoideum*: effects of density, food and pond drying. *Ecology*, **68**: 994-1002.
- Semlitsch, R.D. 2002. Critical elements for biologically based recovery plans of aquatic-breeding amphibians. *Conservation Biology*, **16**: 619-629.
- Semlitsch, R.D and Wilbur, H.M. 1988. Effects of pond drying time on metamorphosis and survival in the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, **1988**: 978-983.
- Semlitsch, R.D. and Reyer, H.U. 1992. Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interactions with pond drying and interspecific. *Evolution*, **46**: 665-676.

- Skelly, D.K. and Werner, E.E. 1990. Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. *Ecology*, **71**: 2313-2322.
- Smirnov, S.V. 1992. The influence of variation in larval period on adult cranial diversity in *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae). *Journal of Zoology*, **226**: 601-612.
- StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stevens, V.M., Polus, E., Wesselingh, R.A., Schtickzelle, N. and Baguette, M. 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Landscape Ecology*, **19**: 829-842.
- Sultan, S.E. and Spencer, H.G. 2002. Metapopulation structure favours plasticity over local adaptation. *American Naturalist*, **160**: 271-283.
- Van Buskirk, J. and Schmidt, B. R. 2000. Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, **81**: 3009-3028.
- Via, S. and Lande, R. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*, **39**: 505-522.
- Wassersug, R.J. and Hoff, K. 1982. Developmental changes in the orientation of the anuran jaw suspension: a preliminary exploration into the evolution of anuran metamorphosis. *Evol. Biol.*, **15**: 223-246.
- Whitlock, M.C. 1996. The red queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *American Naturalist*, **148**: S65-S77.
- Wilbur, H.M. 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology*, **68**: 1437-1452.

Table 1.1. Physical characteristics of the studied ponds.

Pond	Area(m <sup>2</sup> )	Maximum diameter (m)	Hydroperiod (days)	Mean temperature (°C)*	Desiccation level
1	2.359	1.92	65	29.29	Medium
2	6.851	3.47	57	30.57	High
3	5.220	3.22	57	30.44	High
4	22.373	8.12	92	28.69	Low
5	17.434	10.86	92	28.23	Low
6	21.565	11.69	71	28.52	Medium
7	13.695	5.2	71	26.02	Medium
8	2.066	1.9	51	30.00	High
9	9.775	2.01	78	25.78	Medium
10	70.017	13.85	86	27.14	Low

*Note:* Values correspond to the mean temperature between 11:00 and 18:00 hours.

Table 1.2. Results of mixed model analysis for a) snout-vent length (SVL) and b) age at metamorphosis. All variables were  $\log_{10}$  transformed.

a) Snouth-vent length (SVL)

SVL	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Pond area	-0.007592	0.015836	-0.48	0.632	-0.038631	0.023446
Pond number	0.061084	0.090419	0.68	0.499	-0.116133	0.238302
Hydroperiod	0.036862	0.018975	1.94	0.052	-0.000328	0.074052
Const.	8.629061	1.357701	6.36	0.001	5.968015	11.29011

b) Age at metamorphosis.

Age	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Pond area	0.001243	0.000869	1.43	0.153	-0.000460	0.002947
Pond number	0.005316	0.005008	1.06	0.289	-0.004500	0.015132
Hydroperiod	0.003873	0.000959	4.04	0.001	0.001992	0.005754
Const.	3.642578	0.075147	48.47	0.001	3.495291	3.789864

Table 1.3. Results of multivariate (MANCOVA) and univariate (ANCOVA) analyses of covariance for morphological traits of toadlets at metamorphosis. Snout-vent length (SVL) was used as the covariate in all cases. All variables were  $\log_{10}$  transformed.

Analysis	Factor	Dependent variable	Wilks' $\lambda$	d.f.	MS effect	<i>F</i>	<i>P</i>
MANCOVA	Treatment		0.846542	9,18		2.3164	< 0.005
	Covariate		0.151372	9,18		149.50	< 0.001
ANCOVA		Head width		2,248	0.000371	0.9548	0.386
		Head height		2,248	0.003573	1.9281	0.148
		Mandible width		2,248	0.000790	0.6856	0.505
		Nose-mouth distance		2,248	0.014208	7.0803	< 0.005
		Distance between nostrils		2,248	0.001049	0.4614	0.631
		Eye diameter		2,248	0.005085	3.3506	< 0.05
		Interorbital width		2,248	0.000722	0.3875	0.679
		Forelimb length		2,248	0.000802	0.7174	0.489
		Hind limb length		2,248	0.002750	3.2446	< 0.05



Figure 1.1. Toadlet morphological measures. The ten measured traits were: SVL = snout-vent length; HW = head width; HH = head height; MW = mandible width; ND = nose-mouth distance; BN = distance between nostrils; ED = eye diameter; IW = interorbital width; FL = forelimb length; HLL = hind limb length (a + b + c).

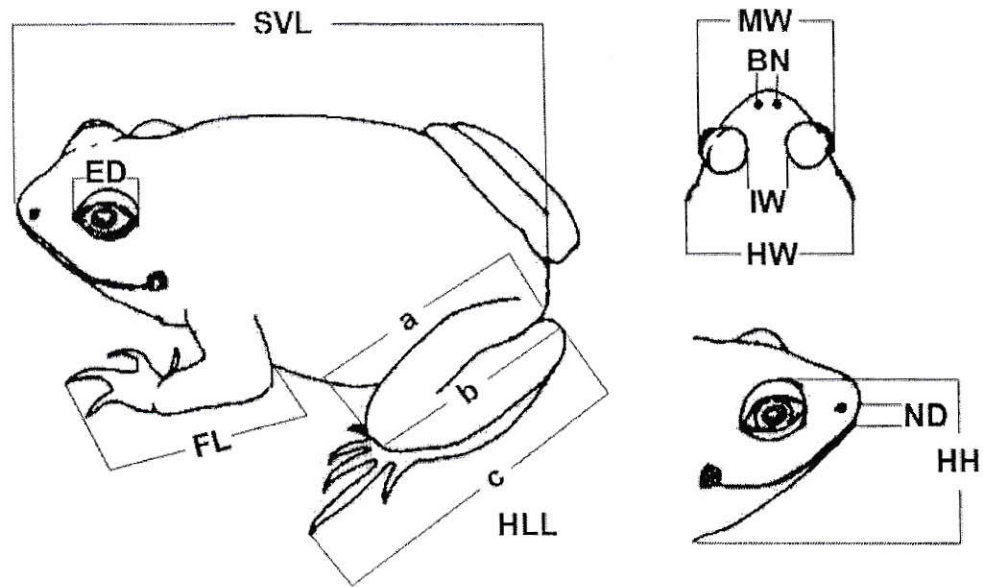


Figure 1.2. Mean body length at metamorphosis (snout-vent length: SVL) for the three desiccation levels.

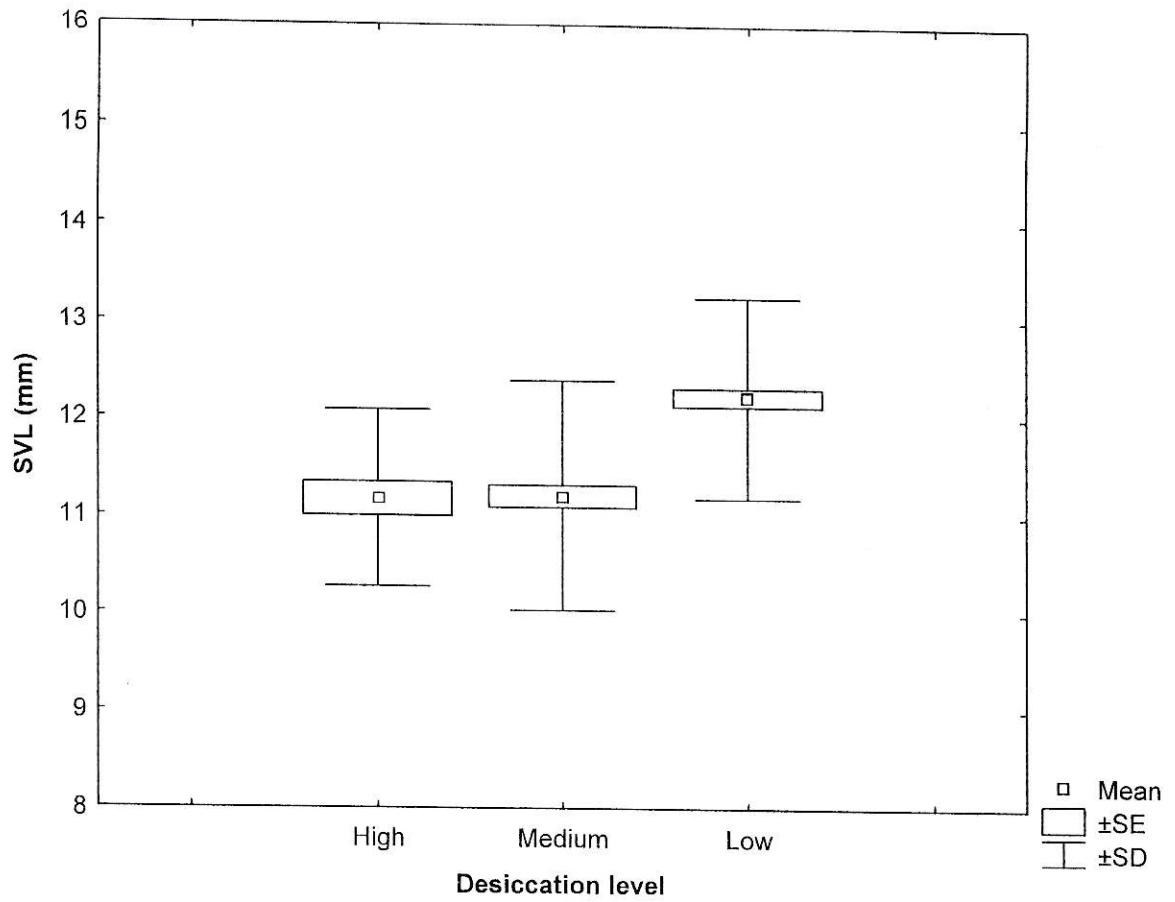
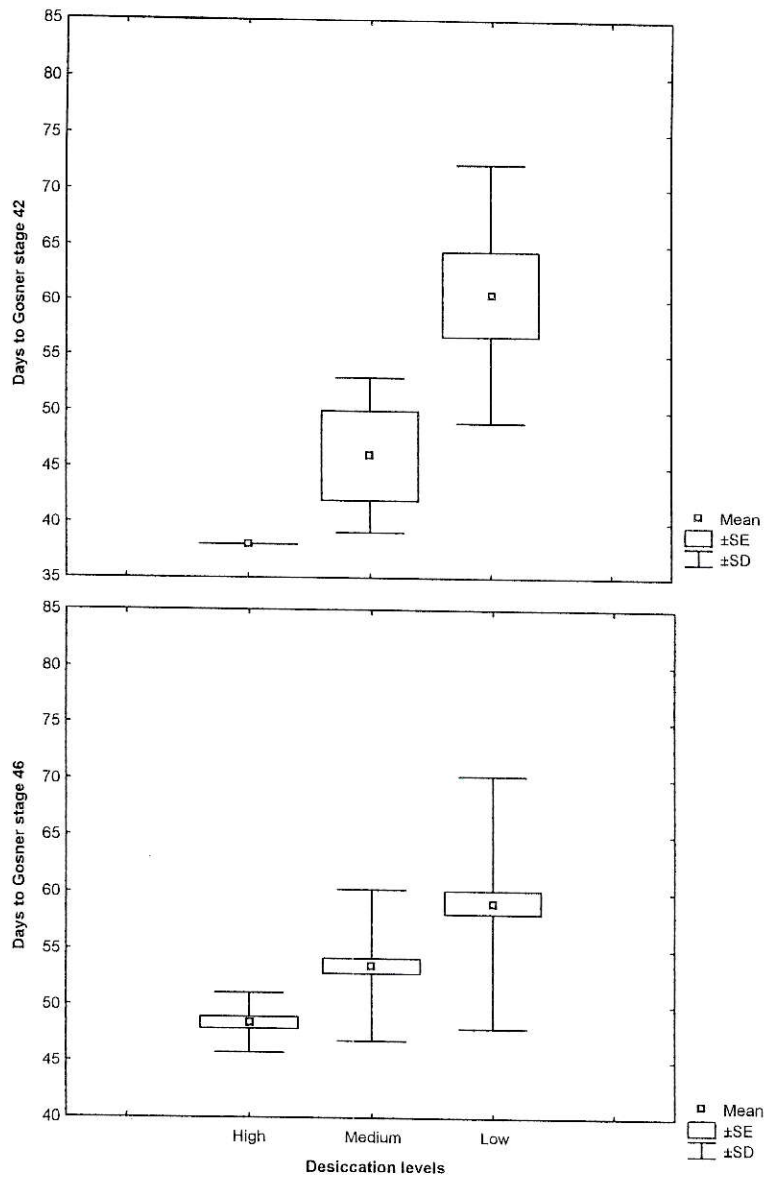


Figure 1.3. Time to development at Gosner stage 42 and at metamorphosis (Gosner stage 46) for the three desiccation levels.



Título corto: Variación de atributos de historia de vida en *Rhinella spinulosa*

**VARIACIÓN DE ATRIBUTOS DE HISTORIA DE VIDA DEL ANURO**  
***Rhinella spinulosa* EN RESPUESTA A LA DESECACIÓN DE LAS POZAS:**  
**UN EXPERIMENTO MANIPULATIVO DE CAMPO**

M. Márquez-García<sup>1</sup>, M. Correa-Solis<sup>1</sup>, M. Sallaberry<sup>2</sup> y M.A. Méndez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Evolución, INTA, Universidad de Chile. Casilla 138-11,  
Santiago, Chile

<sup>2</sup>Laboratorio de Zoología de Vertebrados, Departamento de Ciencias Ecológicas,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago, Chile.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. e-mail: [mmendez@inta.cl](mailto:mmendez@inta.cl)

## RESUMEN

**Hipótesis:** Las restricciones temporales del hábitat promueven la variación de atributos de historia de vida en larvas de anuros, lo cual tiene costos asociados.

**Organismo:** El anuro *Rhinella spinulosa* de la cordillera de los Andes de Chile central.

**Tiempo y lugar:** Entre Diciembre de 2007 y Marzo de 2008, en la localidad de La Parva, en los Andes de Chile central (33°19'S, 70°17'W; 2.601 msnm).

**Métodos:** Se construyó un sistema de 12 pozas artificiales con dos niveles de desecación (alto y bajo), considerando seis réplicas por tratamiento. Se midió el tiempo de desarrollo, el tamaño y la edad a la metamorfosis, así como el largo de la pata posterior en individuos provenientes de los dos tratamientos. Adicionalmente, se tomaron registros diarios de la temperatura del agua.

**Resultados:** Las pozas con mayor desecación presentaron las temperaturas medias y máximas más altas. Las larvas provenientes de este tratamiento aceleraron el desarrollo alcanzando la metamorfosis a una menor edad respecto de las larvas provenientes del nivel de desecación bajo. El tamaño a la metamorfosis y el largo de la extremidad posterior no varió entre los tratamientos.

**Conclusiones:** La naturaleza adaptativa de la plasticidad en función de la desecación sólo es evidente en la edad a la metamorfosis y en las tasas de diferenciación, mientras que en los atributos morfológicos no se expresa. Lo anterior sugiere la existencia de una modulación diferencial de estos rasgos en función de la desecación.

*Palabras claves:* ambientes variables, *trade offs*, desarrollo, tamaño a la metamorfosis, experimento manipulativo, pozas artificiales.

## INTRODUCCIÓN

Muchos organismos que habitan en ambientes heterogéneos muestran plasticidad fenotípica en atributos de historia de vida relacionados con la adecuación biológica (Gervasi y Foufopoulos, 2008). Uno de los aspectos centrales de la teoría de historias de vida es la existencia de *trade offs* entre los beneficios obtenidos por la plasticidad de un rasgo y las consecuencias de dicha plasticidad en otros atributos que afectan la adecuación biológica (Stearns, 1989; Newman, 1992; Roff, 1992). Los organismos con ciclos de vida complejos, constituyen modelos particularmente interesantes para evaluar las implicancias de la plasticidad fenotípica en atributos de historia de vida en ambientes variables [ej. insectos (Bradshaw y Johnson, 1995; Gotthard, 1998), crustáceos (Hentschel y Emlet, 2000), peces (Reznick, 1990) y anfibios (Rowe y Ludwig, 1991; Morey y Reznick, 2004; Rudolf y Rodel, 2007)].

Modelos recientes han incorporado la influencia de las restricciones de tiempo (ej. duración del hábitat y estacionalidad) en el desarrollo y consecuentemente, en el tamaño y edad a la metamorfosis (Rowe y Ludwig, 1991; Abrams *et al.*, 1996; Rudolf y Rodel, 2007). En general, se ha reportado que el tamaño a la metamorfosis estaría positivamente correlacionado con la sobrevivencia y la reproducción, sin embargo un tamaño a la metamorfosis mayor requiere más tiempo para crecer, resultando en una mayor edad a la metamorfosis (Roff, 1992; Stearns, 1992). Ahora bien, cuando el riesgo de mortalidad en el ambiente larval se incrementa en función del tiempo, es esperable que se favorezca una menor edad a la metamorfosis a pesar de los costos asociados con un menor tamaño corporal (Wilbur, 1980; Werner, 1986; Brady y Griffiths, 2000). Por ejemplo, muchas especies de anfibios que experimentan un desarrollo larval en pozas

temporales, aceleran su desarrollo con el fin de evitar la mortalidad por desecación (Wilbur, 1987; Newman, 1988, 1992; Laurila y Kujasalo, 1999; Loman, 1999; Loman y Claesson, 2003). Por esta razón, los anfibios constituyen un modelo excepcionalmente útil para evaluar como la duración del hábitat ha dado forma a la evolución de la plasticidad fenotípica.

Si bien, existen numerosos trabajos que documentan la plasticidad de atributos de historia de vida de anfibios en relación a la desecación de las pozas (ej. Newman, 1992; Denver, 1997; Denver *et al.*, 1998; Richter-Boix *et al.*, 2006), éstos se han llevado a cabo principalmente en condiciones de laboratorio, siendo menos frecuentes los estudios realizados en condiciones de terreno (ej. Newman, 1989; Tejedo y Reques, 1994; Loman, 2002; Morey y Reznick, 2004). Estos experimentos pueden ser manipulativos, donde el investigador manipula físicamente algunos atributos del sistema, o naturales donde el investigador simplemente observa o mide el sistema en diferentes tiempos o lugares (Hulbert, 1984; Grez y Bustamante-Sánchez, 2006). Una de las desventajas de los experimentos naturales es que no permiten la regulación de variables independientes por lo que es fácil confundir las causas de las respuestas observadas (Diamond, 1986). En este sentido, los experimentos manipulativos de campo tienen la ventaja de permitir la regulación de variables independientes, así como manejar el número de réplicas y el rango de manipulaciones (Diamond, 1986).

En este estudio evaluamos la variación de atributos de historia de vida en el anuro *Rhinella spinulosa*, especie que se reproduce en pozas temporales de distinta duración en la zona central del país, y donde las mortalidades por desecación son eventos frecuentes. A través de un experimento manipulativo de campo exploramos la respuesta de las

larvas a la desecación del hábitat. Construimos un sistema de pozas artificiales con dos niveles de desecación en un sector de la Cordillera de los Andes de Chile central, y medimos la tasa de desarrollo, la edad y el tamaño a la metamorfosis en individuos de esta especie. Nosotros proponemos que las restricciones temporales del hábitat promueven la variación en estos atributos de historia de vida.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Especie de estudio

*Rhinella spinulosa* Wiegmann, 1835 (Anura: Bufonidae), presenta en Chile un amplio rango de distribución geográfica (Veloso *et al.*, 1982; Veloso y Navarro, 1988). Su tolerancia fisiológica al estrés hídrico y térmico, le permite habitar desde los 1000 hasta los 4600 msnm (Veloso *et al.*, 1982; Ruiz *et al.*, 1989). En un estudio realizado con larvas de *Rhinella spinulosa* provenientes de distintas localidades (Tatio, Quebrada de Jere y Farellones), se encontró que los individuos de Farellones (zona central de Chile) presentaron los menores tiempos a la metamorfosis y las mayores tasas de crecimiento en comparación a las otras localidades del Norte de Chile (Jiménez-Huidobro, 2008). En dicho estudio, se postuló que estas diferencias en atributos de historia de vida estarían sugiriendo adaptación local por parte de las larvas de Farellones al régimen natural de desecación de pozas. Por lo tanto, resulta interesante en esta localidad, estudiar la existencia de plasticidad fenotípica en atributos de historia de vida para esta especie en función de la desecación, a una escala microgeográfica, despejando así otros factores relacionados como la variación altitudinal o latitudinal descrita para esta especie (Méndez *et al.*, 2004).

### Pozas artificiales y manipulación de la desecación

Se construyó un sistema de 12 pozas artificiales en un sector de La Parva, Cordillera de los Andes, Región Metropolitana, Chile (33°19'55,8''S; 70°17'56,9''W, Altitud: 2601 msnm). El sistema consideró dos niveles de desecación, por lo que se cavaron hoyos de un metro de diámetro cada uno y a dos profundidades (15 y 30 cm), construyendo seis réplicas por tratamiento. Estos hoyos se cubrieron con un plástico para

evitar el drenaje del agua y fueron llenados con 50 y 100 litros de agua respectivamente. La figura 2.1 muestra la disposición espacial de las pozas artificiales.

Las pozas con 50 litros de agua constituyeron el tratamiento de desecación alto. En estas pozas el agua se evaporó naturalmente los primeros días del experimento, hasta que fue necesario rellenar con volúmenes de agua descendente para completar un hidroperíodo de 65 días. Por otra parte, las pozas con 100 litros de agua constituyeron el tratamiento de desecación bajo. En estas pozas se mantuvo este volumen de agua constante hasta los 65 días de experimento. Luego se permitió que el agua se evaporara naturalmente hasta completar un hidroperíodo de 100 días.

### **Procedimiento experimental**

Las larvas de *Rhinella spinulosa* se obtuvieron en un arroyo cercano al área de estudio, donde se recolectaron tres puestas el 30 de Noviembre del 2007. Estas puestas fueron llevadas al laboratorio donde se mantuvieron con aireación y una vez eclosionadas, se alimentaron con lechuga cocida *ad libitum*. Cuando las larvas alcanzaron el estadio 25 de Gosner (Gosner, 1960), cada puesta fue dividida en 12 partes iguales, las cuales se mezclaron y generaron 12 grupos de 167 larvas cada una. Cada grupo compuesto por larvas de las tres puestas recolectadas fue montado el 12 de Diciembre del 2007 en cada una de las pozas artificiales. Este procedimiento permitió disminuir el posible efecto materno sobre el tamaño del huevo, y por ende sobre el tamaño a la metamorfosis. Las pozas se mantuvieron con el volumen de agua constante hasta el 30 de Diciembre, cuando se permitió que comenzara la evaporación natural del tratamiento de desecación alto. Durante el transcurso del experimento, para mantener la adecuada oxigenación del agua, las pozas fueron aireadas una hora día por medio,

utilizando bombas de aire a pilas regulable Aquadine. Las larvas fueron alimentadas cada tres días con una cantidad moderada de la microalga *Spyrogira* sp. (colectada en charcos naturales) con el objeto de evitar la eutroficación de las pozas.

Se ha descrito que la temperatura del agua varía en función de la desecación (Newman, 1989) y que por tanto, podría constituir una señal clave a la desecación inminente del hábitat (Morey y Reznick, 2004). Por esta razón, realizamos registros diarios de la temperatura del agua, entre las 9:00 y las 19:00 hrs, utilizando un termómetro digital WTW.

### **Tiempo de desarrollo**

Se realizaron muestreos semanales para determinar el estado de desarrollo de las larvas por tratamiento. El muestreo consistió en recolectar diez larvas por poza, las cuales fueron devueltas al agua una vez que se les determinó su estado de desarrollo utilizando la tabla de Gosner (Gosner 1960). De este modo, se obtuvieron las frecuencias de individuos para cada estado de desarrollo en el tiempo y por tratamiento.

### **Tamaño y edad a la metamorfosis**

Cuando las larvas comenzaron a metamorfosear, aproximadamente el 10 de Enero de 2008 (12 días de experimento), se procedió a recolectar diariamente individuos por poza cuyos estadios fueran 44 o 45 de Gosner (1960). Estos fueron anestesiados con MS-222 (tricaine methanesulfonate) al 0,02%, de acuerdo con Anholt *et al.* (1998), y se les midió el largo antero-posterior (SVL) con un pie de metro digital (0,02 mm de precisión). Adicionalmente al SVL se midió el largo de la pata posterior, ya que se ha descrito que este rasgo, producto de la desecación de las pozas, varía independientemente del tamaño corporal, siendo más corto en pozas más efímeras (ej.

Newman, 1989; Richter-Boix *et al.*, 2006). Este rasgo además, se encuentra estrechamente relacionado con el desempeño de salto (ej. Ficetola y De Bernardi, 2006), atributo clave para obtener alimento y/o escapar de los depredadores (Wassersug y Sperry, 1977; Henein y Hammond, 1997).

Con el fin de evitar la recaptura de los individuos medidos una vez devueltos a su poza de origen, los postmetamórficos fueron marcados con un polímero fluorescente desarrollado por Northwest Marine Technology Inc., denominado Visible Implant Elastomer (VIE), el cual es inerte biológicamente. La edad a la metamorfosis (número de días en llegar al estadio 44 o 45 de Gosner desde el inicio del experimento) se registró para cada uno de los ejemplares postmetamórficos recolectados.

#### **Análisis estadísticos**

Para evaluar la existencia de autocorrelación espacial entre las unidades experimentales, realizamos pruebas parciales de Mantel utilizando: (a) la matriz de distancias en las mediciones de variables dependientes entre las réplicas, (b) la matriz de distancias euclidianas entre las pozas y (c) la matriz de diseño experimental (que expresa los diferentes tratamientos a los que fueron expuestas las unidades experimentales). De este modo, investigamos si el tamaño y la edad a la metamorfosis estaban espacialmente autocorrelacionados, mientras el efecto de los tratamientos se mantenía constante. Estos análisis se realizaron con el programa XLSTAT versión 2009.1.02 (Addinsoft, 2005) con 1000 permutaciones. Los resultados mostraron que la localización espacial de las pozas no afectó el tamaño ( $r = 0.190$ ,  $P = 0.127$ ) ni la edad a la metamorfosis ( $r = -0.07$ ,  $P = 0.514$ ), sugiriendo que no existe dependencia espacial entre las réplicas. Por este motivo, decidimos no utilizar la información geográfica en los análisis posteriores.

Para comparar las frecuencias de individuos por estadio de desarrollo entre los dos tratamientos, para cada una de las fechas muestreadas, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La edad a la metamorfosis se analizó con una prueba no paramétrica para comparar dos muestras independientes (Prueba de Mann-Whitney U), utilizando como variable independiente el nivel de desecación. El efecto de los tratamientos en el tamaño a la metamorfosis se determinó con una prueba t de Student. El largo de la pata posterior se analizó con un análisis univariado de la covarianza, utilizando el SVL como covariable, y la desecación como variable independiente. Estos datos fueron transformados a logaritmo<sub>10</sub> para dar cumplimiento con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Por otra parte, la variación de las temperaturas medias, máximas y mínimas entre los tratamientos, se analizaron de forma independiente utilizando la prueba de Mann-Whitney U, debido a que estos datos no presentaron una distribución normal. Todos estos análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2001).

## RESULTADOS

### Temperatura del agua

La tabla 2.1 muestra el promedio de las temperaturas diarias, mínimas y máximas por nivel de desecación. El nivel de desecación alto presentó una mayor temperatura promedio que el nivel de desecación bajo ( $U = 73691$ ,  $P < 0.001$ ; Mann-Whitney U-test). En cuanto a la oscilación térmica diaria, las pozas con mayor desecación presentaron las temperaturas mínimas más bajas, así como las temperaturas máximas más altas. Estas diferencias no fueron significativas para las temperaturas mínimas ( $U = 379$ ,  $P = 0.11$ ; Mann-Whitney U-test), como si lo fueron para las temperaturas máximas ( $U = 231$ ,  $P < 0.001$ ; Mann-Whitney U-test).

Para evaluar si el tamaño y la edad a la metamorfosis estaban correlacionados con la temperatura promedio de cada poza, realizamos pruebas parciales de Mantel manteniendo el efecto de los tratamientos constante. Los resultados muestran que no existe correlación para el tamaño ( $r = -0.081$ ,  $P = 0.527$ ) ni la edad a la metamorfosis ( $r = 0.015$ ,  $P = 0.908$ ), sugiriendo un efecto de los tratamientos independiente de la temperatura.

### Desarrollo y edad a la metamorfosis

Las distribuciones de las frecuencias de desarrollo fueron distintas entre los tratamientos a partir de la segunda semana de experimento (Figura 2.2). El 4 de enero no se detectaron diferencias entre los niveles de desecación ( $P > 0.1$ ; prueba de Kolmogorov-Smirnov), mientras que para los muestreos siguientes el desarrollo fue significativamente mayor en aquellas larvas provenientes del tratamiento de desecación alto (14 de enero,  $P < 0.05$ ; 25 de enero,  $P < 0.001$ ; 1 de febrero,  $P < 0.005$ ; 11 febrero,

$P < 0.005$ ; pruebas de Kolmogorov-Smirnov). La edad promedio a la metamorfosis en este nivel de desecación fue de 53 días  $\pm$  0.8 ( $n = 136$ ), mientras que para el nivel de desecación bajo la edad promedio fue de 67 días  $\pm$  1.4 ( $n = 157$ ), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $U = 5531$ ,  $P < 0.001$ ; Mann-Whitney U-test).

#### **Tamaño a la metamorfosis**

El tamaño a la metamorfosis no varió entre los tratamientos (t de Student,  $F_{1,290} = 1.04$ ,  $P = 0.8$ ). Los postmetamórficos del nivel de desecación alto alcanzaron la metamorfosis a un tamaño promedio de 10.83 mm  $\pm$  0.06 ( $n = 136$ ), similar al tamaño promedio encontrado en el nivel de desecación bajo, que fue de 10.78 mm  $\pm$  0.05 ( $n = 157$ ) (Figura 2.3). Asimismo, la desecación no tuvo un efecto significativo en el largo de la pata posterior (ANCOVA,  $F_{1,290} = 1.16$ ,  $P = 0.28$ ).

## DISCUSIÓN

En general, se ha determinado que en respuesta al riesgo de desecación los organismos aceleran su desarrollo con el objeto de alcanzar la metamorfosis en menos tiempo, lo que tiene como costo el metamorfosear a un menor tamaño (Newman, 1988, 1989; Laurila y Kujasalo, 1999; Merilä *et al.*, 2000; Laurila *et al.*, 2002; Loman y Claesson, 2003; Richter-Boix *et al.*, 2006). Algunos experimentos naturales y de campo realizados en distintas especies de anfibios han reportado un patrón similar al observado en condiciones de laboratorio, revelando que periodos larvales prolongados tienden a estar asociados con mayores tamaños a la metamorfosis (ej. Newman, 1989; Morey 1998; Morey y Reznick, 2004). En nuestro experimento las larvas aceleraron el desarrollo en respuesta a la desecación del hábitat, alcanzando la metamorfosis a una menor edad pero a un tamaño similar que aquellas larvas que retrasaron la metamorfosis. Este tipo de respuesta ha sido observada en pozas naturales y experimentales asociado a bajas densidades larvales (ej. Tejedo y Reques, 1994; Loman, 2002). Tejedo y Reques (1994) encontraron en el anuro *Bufo calamita*, que el efecto del hidroperíodo variaba en función de la densidad larval, dando cuenta de una interacción entre ambos factores. De este modo, las pozas de mayor duración presentaron los mayores tamaños a la metamorfosis solamente a altas densidades de individuos. Las densidades iniciales de larvas en nuestro experimento (3.34 y 1.67 ind/L) fueron bastante bajas en comparación a las densidades naturales encontradas para esta especie. El número promedio de larvas que eclosiona por puesta es de 3000 individuos y normalmente existe más de una puesta por poza (datos no publicados). Por lo tanto, es probable que el patrón observado en nuestras pozas experimentales responda a la baja densidad inicial de larvas montadas.



El experimento de campo realizado por Tejedo y Reques (1994) demostró que la duración de la poza, la densidad larval y la cantidad de alimento afectaron significativamente la respuesta combinada de sobrevivencia, tamaño y edad a la metamorfosis. Según Lind *et al.* (2008) la disponibilidad de alimento juega un rol fundamental en el umbral de desarrollo, el cual corresponde al tamaño mínimo que debe alcanzar un organismo antes que la metamorfosis ocurra. En este sentido, el modelo de umbrales propuesto por Wilbur y Collins (1973) y luego formalizado por Day y Rowe (2002), predice que bajo condiciones de abundante recurso el incremento diario en la masa corporal es sustancial, y que por tanto el retrasar la metamorfosis una vez que se ha sobrepasado el umbral de desarrollo generará un gran aumento en el tamaño a la metamorfosis. En contraste, bajo condiciones pobres en recurso el incremento diario en la masa corporal es tan pequeño que los individuos no ganan mucho retrasando la metamorfosis, por lo que la transición ocurrirá cuando se alcance el tamaño umbral de desarrollo (Day y Rowe, 2002). La predicción del modelo de umbrales puede constituir una explicación plausible al patrón observado en nuestro experimento respecto al tamaño a la metamorfosis, el cual no varió entre los tratamientos. Probablemente, la calidad del alimento y los posibles requerimientos nutricionales por parte de las larvas, hayan contribuido a que los individuos metamorfosearan al tamaño umbral de desarrollo en ambos tratamientos. En nuestro experimento las larvas sólo disponían del alga *Spyrogira* sp. para alimentarse, mientras que en condiciones naturales las larvas disponen además de la película de barro del fondo de cada poza, del que presumiblemente obtienen algún nutriente necesario para crecer. Se ha documentado para distintas especies de anfibios, que la calidad del alimento modula la respuesta de

atributos de historia de vida, incluyendo el tamaño a la metamorfosis (revisado por Kupfferberg 1997; Wassersug, 1997). Kupfferberg (1997) señala que las larvas de *Rana boylei* alimentadas sólo con el alga *Cladophora*, presentaron trayectorias de crecimiento menores en comparación a otros tratamientos que incluían *Cladophora*-epífitos y un alimento artificial rico en proteínas (Reptomín). En este contexto, es probable que la monodieta de *Spyrogira* sp. haya influido en el tamaño a la metamorfosis observado en ambos tratamientos, llevándonos a suponer que factores independientes a la desecación del hábitat contribuyen a determinar si la metamorfosis ocurre en el umbral de desarrollo o a un tamaño mayor.

En cuanto al tiempo de desarrollo, los resultados muestran que las larvas de *Rhinella spinulosa* son capaces de ajustar sus tasas de diferenciación en respuesta al régimen de desecación. Una plasticidad similar ha sido reportada para otros anfibios (Semlitsch, 1987; Wilbur, 1987; Newman, 1988, 1989; Semlitsch *et al.* 1988; Crump, 1989), aunque en otras especies esta plasticidad no ha sido encontrada (Wilbur, 1987; Semlitsch y Wilbur, 1988; Semlitsch y Reyer, 1992). La existencia de un *trade off* entre el tiempo de desarrollo y el tamaño a la metamorfosis parece ser un prerequisite para argumentar que la plasticidad en el desarrollo es adaptativa (Tejedo y Reques, 1994). Sin embargo, muchos mecanismos pueden imponer una variabilidad reducida en el tamaño a la metamorfosis promoviendo la dilución de este *trade off*. En nuestro estudio, la presunta ventaja adaptativa de retrasar la metamorfosis en pozas de mayor duración no fue encontrada. Así, la naturaleza adaptativa de la plasticidad en las tasas de desarrollo como función de la desecación no es aparente en nuestras pozas experimentales, ya que

probablemente se ve diluida por otros factores como la calidad del recurso alimenticio y la baja densidad de individuos.

Las larvas del tratamiento de desecación alto aceleraron su desarrollo a partir de la segunda semana de experimento (Figura 2.2), tiempo durante el cual probablemente las larvas detecten señales específicas asociadas a la desecación (ver Newman, 1992). Si bien, estas señales específicas permanecen desconocidas, un candidato podría ser la temperatura del agua (Newman, 1989; Morey y Reznick, 2004). Se ha documentado que las pozas de menor duración tienden a presentar mayores fluctuaciones diarias, registrando las temperaturas máximas más altas, pero también las temperaturas mínimas más bajas (Brady y Griffiths, 2000). En cuanto a la temperatura media, se ha reportado que pozas temporales y permanentes en una misma región, presentan medias similares durante la época en que ocurre el desarrollo larval (Semlitsch y Wilbur, 1988; Newman, 1989; Morey y Reznick, 2004). Nuestros resultados muestran que las pozas con mayor desecación presentan las temperaturas medias y máximas más altas, presentando en consecuencia, mayores fluctuaciones diarias. Por lo tanto, la variación en la temperatura del agua podría constituir una señal clave a la desecación del hábitat en nuestro experimento, pero probablemente no sea la única ni la más importante. En este sentido, los resultados obtenidos por las pruebas parciales de Mantel, sugieren que el efecto de los tratamientos en la edad y el tamaño a la metamorfosis no estuvo mediado exclusivamente por la temperatura. Los resultados del estudio de Laurila y Kujasalo (1999) en *Rana temporaria*, indican que las larvas son capaces de responder a la desecación acelerando su desarrollo, y que la temperatura no sería necesaria para inducir la plasticidad adaptativa. Asimismo, los experimentos de laboratorio realizados por

Denver *et al.* (1998) sugieren que en larvas de *Scaphiopus hammondii* existe una respuesta a la reducción del volumen de agua, más que a la temperatura y a otros cambios relacionados con la desecación. De este modo, es factible que las larvas de *R. spinulosa* respondan a la reducción temporal del volumen de agua y a otros cambios relacionados con la desecación, más que a la variación de la temperatura.

El largo de la pata es un rasgo funcionalmente importante para los anuros (Emerson, 1978, 1985; Duellman y Trueb, 1986). En condiciones naturales, los organismos que retrasan la metamorfosis presentan tibio-fibulas más largas, independientemente del tamaño corporal, y son capaces de saltar más lejos que aquellos individuos que aceleran su desarrollo (Ficetola y De Bernardi, 2006). De esta forma, el ambiente puede inducir variaciones morfométricas afectando las tasas de crecimiento y de diferenciación (Blouin y Brown, 2000). Si bien el nivel de desecación de las pozas artificiales afectó las tasas de diferenciación de las larvas, esto no indujo variación morfométrica en el largo de la pata. Similarmente, Blouin y Loeb (1991) no encontraron un efecto de la variación de la tasa de desarrollo en el largo de la tibio-fíbula, al corregir por el tamaño corporal. Es probable que un bajo porcentaje de la variación morfométrica resulte directamente de efectos ambientales en la tasa de desarrollo, aunque nuestros resultados no permiten concluir al respecto.

Las restricciones temporales del hábitat promueven la variación de atributos de historia de vida en larvas de *R. spinulosa*, sin embargo el valor adaptativo de esta plasticidad aún permanece desconocido. La aproximación experimental utilizada en este estudio permitió la identificación de variables que ayudan a explicar la variación observada. Sin duda, la incorporación de nuevas variables en el diseño experimental, tal

como la calidad del alimento y la densidad de individuos, permitiría entender mejor los patrones observados. Asimismo, medir otras variables que se correlacionan con la disminución del volumen de agua en condiciones naturales, como por ejemplo la química, permitirán establecer mejor cuales son las señales que las larvas detectan para la desecación inminente del hábitat.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Municipalidad de Lo Barnechea, especialmente a Pablo Villoch y Gloria Muñoz, por permitirnos trabajar en sus terrenos y brindarnos alojamiento cerca del sitio experimental. A Rodrigo Pavez, Marjorie Correa, Juan Pablo Núñez, Javiera Cisternas, Paola Henríquez, Héctor Echeverría, Daniella Márquez y Felipe Hernández por su valiosa colaboración en terreno. Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT 1061256. M. Márquez-García agradece el apoyo financiero de la beca CONICYT.

## REFERENCIAS

- Abrams, P.A., Leimar, O., Nylin, S. y Wiklund, C. 1996. The effect of flexible growth rates on optimal sizes and development times in a seasonal environment. *American Naturalist*, **147**: 381-395.
- Addinsoft. 2005. XLSTAT-Pro Your data analysis solution. Software, version 2009.1.02. [www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)
- Anholt, B.R., Negovetic, S. y Som, C. 1998. Methods for anaesthetizing and marking larval anurans. *Herpetological Review*, **29**: 153-154.
- Blouin, M.S. and Loeb, M.L.G. 1991. Effects of environmentally induced development-rate variation on head and limb morphology in the green tree frog, *Hyla cinerea*. *American Naturalist*, **138**: 717-728.
- Blouin, M.S. and Brown, S.T. 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, **125**: 358-361.
- Bradshaw, W.E. y Johnson, K. 1995. Initiation of metamorphosis in the pitcher-plant mosquito: effects of larval growth history. *Ecology*, **76**: 2055-2065.
- Brady, L.D. y Griffiths, R.A. 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *J. Zool., Lond.*, **252**: 61-69.
- Crump, M.L. 1989. Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis. *Copeia*, **1989**: 794-797.
- Day, T. y Rowe, L. 2002. Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life-history transitions. *American Naturalist*, **159**: 338-350.
- Denver, R.J. 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Am. Zool.*, **37**: 172-184.
- Denver, R.J., Mirhadi, N. y Phillips, M. 1998. An experimental analysis of adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: developmental response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology*, **79**: 1859-1872.
- Diamond, J. 1986. Overview: laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. En *Community Ecology* (J. Diamond y T.J. Case, eds.), pp. 3-22. New York: Harper & Row Publishers.
- Duellman, W. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill.

- Emerson, S.B. 1978. Allometry and jumping in frogs: helping the twain to meet. *Evolution*, **32**: 551-564.
- Emerson, S.B. 1985. Skull shape in frogs – correlations with diet. *Herpetologica*, **41**: 177-188.
- Ficetola, G.F. y De Bernardi, F. 2006. Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latastei*. *Evolutionary Ecology*, **20**: 143-158.
- Gervasi, S.S. y Foufopoulos, J. 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, **22**: 100-108.
- Gosner, N. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- Gotthard, K. 1998. Life history plasticity in the satyrine butterfly *Lasiommata petropolitana*: investigating an adaptive reaction norm. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**: 21–39.
- Grez, A.A. y Bustamante-Sánchez, M.A. 2006. Aproximaciones experimentales en estudios de fragmentación. En *Biodiversidad en Ambientes Fragmentados de Chile: Patrones y procesos a diferentes escalas* (A.A Grez, J.A Simonetti y R.O Bustamante, eds), pp. 17-40. Santiago: Editorial Universitaria.
- Henein, J.T. y Hammond, G. 1997. Antipredator behaviors of newly metamorphosed green frogs (*Rana clamitans*) and leopard frogs (*R. pipiens*) in encounters with eastern garter snakes (*Thamnophis s. sirtalis*). *Am. Midl. Nat.*, **137**: 136–144.
- Hentschel, B.T. y Emlet, R.B. 2000. Metamorphosis of barnacle nauplii: effects of food variability and a comparison with amphibian models. *Ecology*, **81**: 3495-3508.
- Hulbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, **54**: 187-211.
- Jiménez-Huidobro, P. 2008. Variación fisiológica y de atributos de historia de vida en función de la temperatura y procedencia geográfica en poblaciones chilenas de *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Kupferberg, S. 1997. The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist*, **37**: 146-159.
- Laurila, A. y Kujasalo, J. 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J. Anim. Ecol.*, **68**: 1123-1132.



- Laurila, A., Karttunen, S. y Merilä, J. 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution*, **56**: 617-627.
- Lind, M.I., Persbo, F. y Johansson, F. 2008. Pool desiccation and developmental thresholds in the common frog, *Rana temporaria*. *Proc. R. Soc. B.*, **275**: 1073-1080.
- Loman, J. 1999. Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia*, **20**: 421-430.
- Loman, J. 2002. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *J. Zool., Lond.*, **258**: 115-129.
- Loman, J. y Claesson, D. 2003. Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: a test of cost models. *Evolutionary Ecology Research*, **5**: 179-194.
- Méndez, M.A., Soto, E.R, Correa, C., Veloso, A., Vergara, E., Sallaberry, M. y Iturra, P. 2004. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, **77**: 559-567.
- Merilä, J., Laurila, A., Pakkala, M., Räsänen, K. y Timenes Laugen, A. 2000. Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Ecoscience*, **7**: 18-24.
- Morey, S.R. 1998. Pool duration influences age and body mass at metamorphosis in the western spadefoot toad: implications for vernal pool conservation. In *Ecology, Conservation, and Management of Vernal Pool Ecosystems – Proceedings from a 1996 Conference* (C.W. Witham, E.T. Bauder, D. Belk, W.R. Ferren Jr. and R. Ornduff, eds.), pp. 86-91. Sacramento: California Native Plant Society.
- Morey, S.R. y Reznick, D.N. 2004. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos*, **104**: 172-190.
- Newman, R.A. 1988. Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution*, **42**: 774-783.
- Newman, R.A. 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, **70**: 1775-1787.
- Newman, R.A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: what type of phenotypic variation is adaptive, and what are the costs of such plasticity. *BioScience*, **42**: 671-678.

- Reznick, D.N. 1990. Plasticity in age and size at maturity in male guppies (*Poecilia reticulata*): an experimental evaluation of alternative models of development. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**: 185–203.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. y Montori, A. 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research*, **8**: 309-320.
- Roff, D.A. 1992. The evolution of life histories: theory and analysis. New York: Chapman & Hall.
- Rowe, L. y Ludwig, D. 1991. Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology*, **72**: 413-427.
- Rudolf, V.H.W y Rodel, M.O. 2007. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under certain time constraints. *Evolutionary Ecology*, **21**: 121-142.
- Ruiz, G., Rosenmann, M. y Veloso, A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **94A**: 643-646.
- Semlitsch, R.D. 1987. Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, **1987**: 61-69.
- Semlitsch, R.D y Wilbur, H.M. 1988. Effects of pond drying time on metamorphosis and survival in the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, **1988**: 978-983.
- Semlitsch, R.D. y Reyer, H.U. 1992. Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interactions with pond drying and interspecific. *Evolution*, **46**: 665-676.
- Semlitsch, R.D., Scott, D.E. y Pechmann, J.H.K. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, **69**: 184-192.
- StatSoft. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stearns, S.C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology*, **3**: 259-268.
- Stearns, S.C. 1992. The evolution of life histories. New York: Oxford University Press.
- Tejedo, M. y Reques, R. 1994. Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: the interactive effects of density and pond duration. *Oikos*, **71**: 295-304.

- Veloso, A. y Navarro, J. 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., Sallaberry, M., Navarro, J., Iturra, P., Valencia, J., Penna, M. y Díaz, N. 1982. Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. En *El hombre y los ecosistemas de montaña* (MAB 6), pp. 135-265. Santiago, Chile.
- Wassersug, R.J. 1997. Where the tadpole meets the world - Observations and speculations on biomechanical and biochemical factors that influence metamorphosis in anurans. *American Zoologist*, **37**: 124-136.
- Wassersug, R.J. y Sperry, D.G. 1977. The relationship of locomotion to differential predation rate on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology*, **58**: 830-839.
- Werner, E.E. 1986. Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *American Naturalist*, **128**: 319-341.
- Wilbur, H.M. 1980. Complex life-cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**: 67-93.
- Wilbur, H.M. 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology*, **68**: 1437-1452.
- Wilbur, H.M. y Collins, J.P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, **182**: 1305-1314.

Tabla 2.1. Temperaturas medias, mínimas y máximas por nivel de desecación.

Tratamiento	Temperatura (°C)		
	Media	Mínima (9:00 hrs.)	Máxima (14:00 hrs.)
Desecación alta	22.57 ± 0.32	9.38 ± 0.28	28.32 ± 0.55
Desecación baja	19.37 ± 0.25	9.93 ± 0.33	23.00 ± 0.42

Figura 2.1. Red experimental de pozas artificiales con distinto volumen y a dos distancias. Todas las pozas tenían un metro de diámetro. Los círculos negros representan las pozas con nivel de desecación bajo (100 litros de agua) y los círculos blancos representan las pozas con nivel de desecación alto (50 litros de agua). R corresponde al número de réplica.

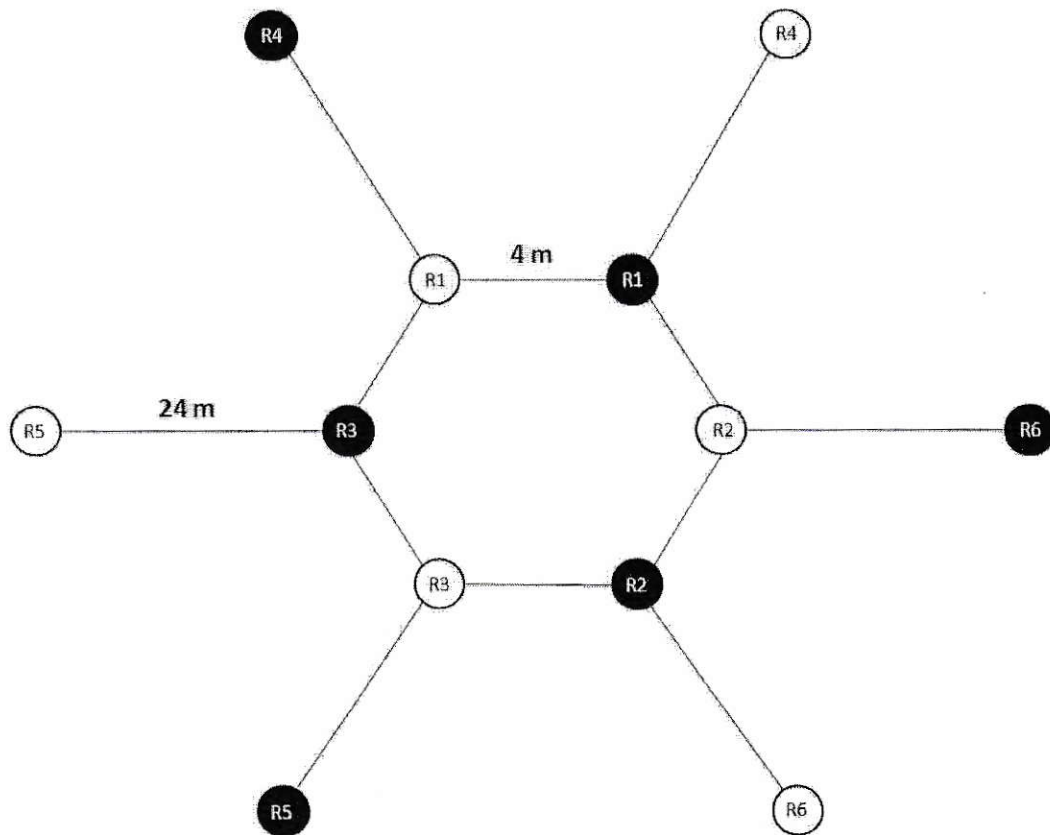


Figura 2.2. Distribución de las frecuencias de desarrollo en larvas provenientes del tratamiento con desecación alto (barras blancas) y del tratamiento con desecación bajo (barras negras). a) 4 enero, b) 14 enero, c) 25 enero, d) 1 febrero y e) 11 febrero, corresponden a las fechas de muestreo.

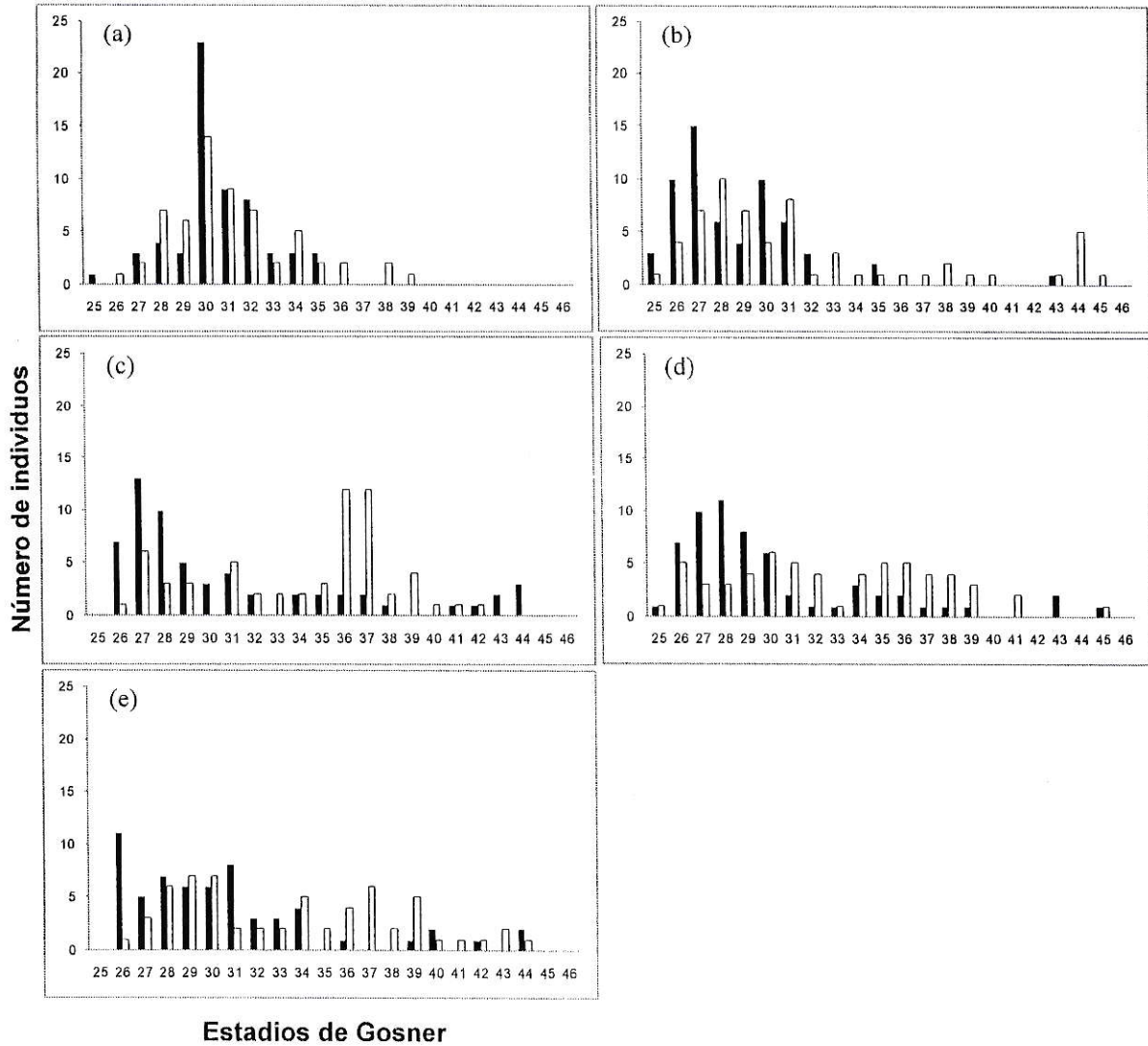
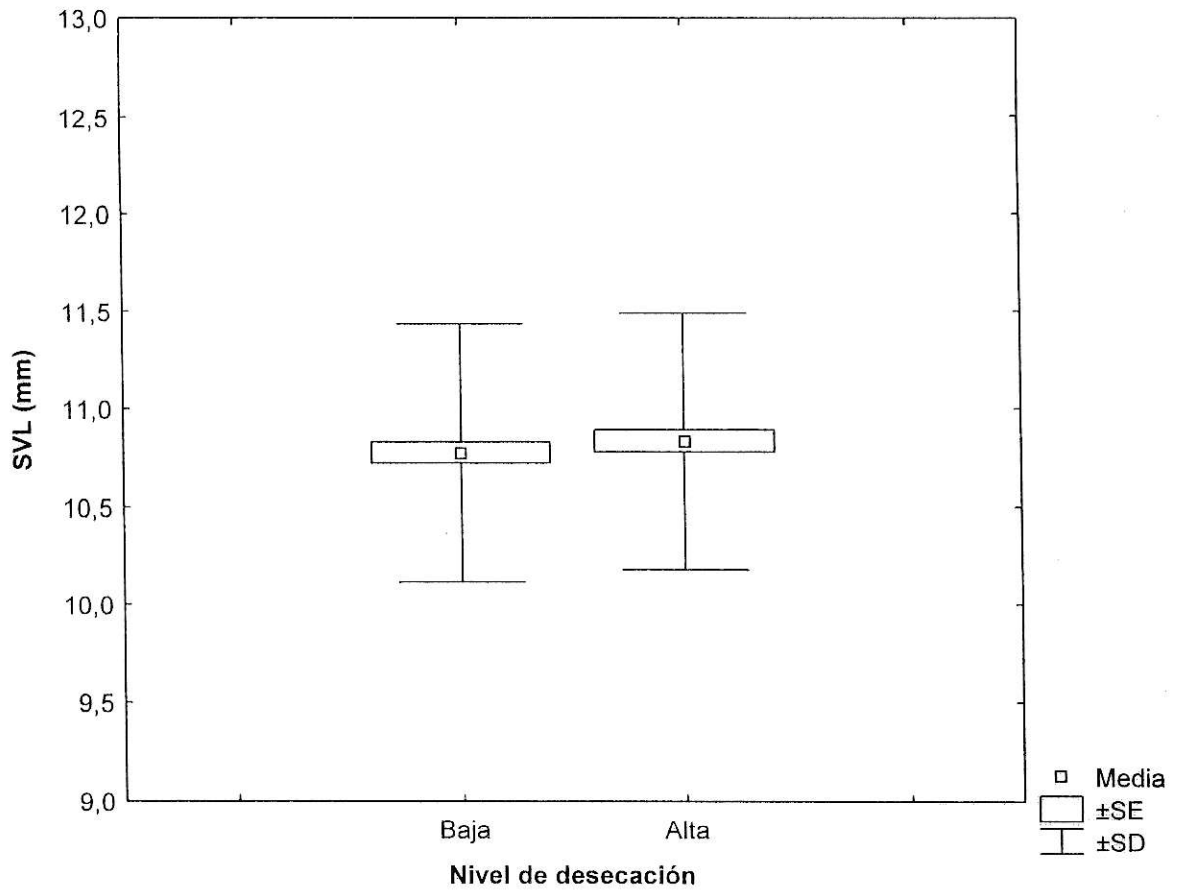


Figura 2.3. Tamaño promedio a la metamorfosis (snout-vent length: SVL) para los dos niveles de desecación.



## DISCUSIÓN GENERAL

Las principales preguntas y resultados obtenidos en los artículos que comprenden esta tesis, se resumen en la tabla 3.1. A continuación se discuten estos resultados y su alcance en relación a la literatura publicada.

Varios autores han postulado que cuando el riesgo de mortalidad en el ambiente larval se incrementa en función del tiempo, como ocurre en las pozas temporales, se favorece una menor edad a la metamorfosis a pesar de los costos asociados con un menor tamaño corporal (Wilbur, 1980; Werner, 1986; Rowe y Ludwig, 1991; Brady y Griffiths, 2000; Rudolf y Rodel, 2007). Las aproximaciones experimentales utilizadas en este estudio muestran que las larvas de *Rhinella spinulosa* aceleran las tasas de desarrollo en respuesta a la desecación del hábitat, plasticidad que les permitiría evitar la mortalidad en pozas de menor duración. Los resultados son consistentes en ambos experimentos: mientras que en el sistema artificial de La Parva el desarrollo fue significativamente mayor en larvas provenientes del tratamiento de desecación alto, alcanzando la metamorfosis a una menor edad promedio, en el sistema natural de Farellones ocurrió el mismo fenómeno, las larvas mostraron menores edades a la metamorfosis a mayores niveles de desecación. Sin embargo, los resultados respecto al tamaño a la metamorfosis muestran patrones diferentes cuando se comparan ambos experimentos. En el sistema natural de Farellones, los postmetamórficos provenientes del nivel de desecación bajo, es decir aquellos que retrasaron la metamorfosis,



presentaron los mayores tamaños corporales (SVL). Por otra parte, en el sistema artificial de La Parva no se detectaron diferencias en el tamaño a la metamorfosis entre los dos niveles de desecación. Estas diferencias podrían ser explicadas básicamente por dos factores: la densidad de individuos y la calidad del alimento, tal como se discute en el segundo manuscrito.

En cuanto a la densidad larval, Tejedo y Reques (1994) encontraron en el anuro *Bufo calamita*, que el efecto del hidroperíodo en el tamaño a la metamorfosis variaba en función de este factor. A bajas densidades, no detectaron diferencias entre pozas de mayor y menor duración, mientras que a altas densidades, las pozas de mayor duración presentaron postmetamórficos más grandes. De este modo, una posible interacción entre la densidad y la desecación podría estar dando cuenta de las diferencias encontradas entre el experimento natural y el manipulativo de campo. Las densidades iniciales de larvas en el experimento de campo (1.67 y 3.34 ind/L) fueron bastante bajas en comparación a las densidades iniciales manejadas en el experimento natural. Considerando que el número promedio de larvas que eclosiona por puesta es de 3000 individuos y que normalmente las pozas naturales contienen entre 100 y 300 litros de agua (datos no publicados), podemos estimar que las densidades iniciales manejadas en el sistema natural iban entre los 10 y 30 ind/L, es decir un orden de magnitud mayor que en el sistema artificial de La Parva. Por lo tanto, es probable que el patrón observado en el tamaño a la metamorfosis responda a la densidad inicial de larvas manejada en cada uno de los experimentos. En efecto, datos de la temporada 2008-2009 muestran que al aumentar la densidad inicial de larvas (12.7 ind/L) en las pozas artificiales se observa el patrón esperado, que aquellos individuos que retrasan la metamorfosis en pozas de

mayor duración presentan un mayor tamaño a la metamorfosis (J. Kramer, comunicación personal).

Otro factor que interactúa con la desecación y la densidad larval en determinar el tamaño y la edad a la metamorfosis es la calidad del alimento (Newman, 1989; Tejedo y Reques, 1994). Según Lind *et al.* (2008) la disponibilidad de alimento juega un rol fundamental en el umbral de desarrollo, el cual corresponde al tamaño mínimo que debe alcanzar un organismo antes que la metamorfosis ocurra. En este sentido, el modelo de umbrales propuesto por Wilbur y Collins (1973) y luego formalizado por Day y Rowe (2002), predice que bajo condiciones de recurso abundante el incremento diario en la masa corporal es sustancial y que por tanto, el retrasar la metamorfosis una vez que se ha sobrepasado el umbral de desarrollo, generará un aumento en el tamaño corporal. En contraste, bajo condiciones pobres en recurso el incremento diario en la masa corporal es tan pequeño que no es ventajoso para los individuos retrasar la metamorfosis, por lo que la transición ocurrirá cuando se alcance el tamaño umbral de desarrollo (Day y Rowe, 2002). La predicción del modelo de umbrales podría explicar las diferencias encontradas en el tamaño a la metamorfosis entre las dos aproximaciones experimentales utilizadas. En el experimento de campo, las larvas sólo disponían del alga *Spyrogira* sp. para alimentarse, mientras que en el experimento natural las larvas disponían además de la película de barro del fondo de cada poza, del que presumiblemente obtienen algún nutriente necesario para crecer. La disponibilidad de nutrientes es considerada como uno de los factores más importantes para explicar la variación en el tamaño y edad a la metamorfosis (Beck, 1997; Alvarez y Nicieza, 2002). En este contexto, el estudio realizado por Benavides *et al.* (2005) en larvas de *R. spinulosa*, demostró que la calidad

nutricional de la dieta influye positivamente en la eficiencia de asimilación energética. De este modo, es probable que la dieta suministrada en el experimento de campo haya sido pobre nutricionalmente en comparación a la dieta dispuesta en el experimento natural, lo que habría contribuido a que las larvas obtuvieran menos energía para crecer y metamorfosearon en el tamaño umbral de desarrollo, aún cuando se retrasara la metamorfosis.

Respecto a la variación morfométrica, los resultados del experimento natural muestran que la desecación tuvo un efecto sobre el diámetro del ojo, la distancia narina boca y el largo de la extremidad posterior, mientras que sobre los otros caracteres evaluados no se detectaron diferencias. Estos atributos morfológicos variaron independientemente del tamaño corporal, siendo mayores en aquellos postmetamórficos provenientes del tratamiento de desecación bajo. Al respecto, se ha documentado que el ancho de la cabeza y el largo de la pata son rasgos funcionalmente importantes para los anuros (Emerson, 1978, 1985; Duellman y Trueb, 1986), y que diferencias en las tasas de crecimiento y diferenciación pueden producir cambios en estos rasgos (Emerson, 1986; Newman, 1989; Blouin y Brown, 2000). En efecto, las restricciones temporales del hábitat larval afectaron las tasas de diferenciación, lo que se reflejó en la variación de la edad a la metamorfosis entre los distintos tratamientos, induciendo probablemente dichas variaciones morfométricas. No obstante, el experimento manipulativo de campo muestra que, aún cuando las tasas de diferenciación se vieron afectadas producto de la desecación, el largo de la extremidad posterior no varió entre los tratamientos. Aquí cabe recordar que el tamaño a la metamorfosis mostró patrones distintos en ambos experimentos, lo que estaría dando cuenta de un efecto diferencial de la desecación en

las tasas de crecimiento, pero no en las tasas de diferenciación. Presumiblemente, estas diferencias en las tasas de crecimiento sean responsables de las variantes morfométricas observadas en ambos experimentos.

El experimento natural realizado en Farellones permitió evaluar el efecto de la desecación en la variación de atributos de *R. spinulosa*, junto a todos los otros cambios que implica la disminución temporal del volumen del agua, como por ejemplo cambios en la temperatura y química (Newman, 1992). Por otra parte, el experimento manipulativo de campo, realizado en la localidad de La Parva, permitió una regulación más precisa de la desecación, así como el control de otras variables independientes como la disponibilidad de alimento y la densidad de individuos. Al contrastar los resultados de ambos experimentos, fue posible identificar las variables que interactúan con la desecación y que afectan la variación fenotípica de *R. spinulosa*. La realización de nuevos experimentos que consideren estos factores, así como la regulación de otras variables que se correlacionan con la disminución del volumen de agua en condiciones naturales (pH, densidad, competencia, entre otras), permitirían descifrar cuales son las señales específicas asociadas a la desecación y cual es el valor adaptativo de la variación fenotípica observada.

Tabla 3.1. Resumen de las principales preguntas y resultados de los dos artículos incluidos en la tesis.

Principales preguntas	Artículo	Principales resultados
¿Cómo afecta la desecación la tasa de desarrollo de las larvas?	I	Las larvas aceleran el desarrollo en respuesta a la desecación de las pozas.
	II	Las larvas aceleran el desarrollo en respuesta a la desecación de las pozas.
¿Cómo afecta la desecación la edad a la metamorfosis?	I	Las larvas alcanzan la metamorfosis a una menor edad en pozas de mayor desecación.
	II	Las larvas alcanzan la metamorfosis a una menor edad en pozas de mayor desecación.
¿Cómo afecta la desecación el tamaño a la metamorfosis?	I	Las larvas alcanzan la metamorfosis a un menor tamaño corporal en pozas de mayor desecación.
	II	No hay diferencias en el tamaño a la metamorfosis entre pozas con distintos niveles de desecación.
¿Cómo afecta la desecación la variación de atributos morfológicos en los postmetamórficos?	I	Los postmetamórficos provenientes de pozas con mayor desecación presentan menores largos de pata posterior, distancia narina-boca y diámetro del ojo.
	II	No hay diferencias en el largo de la pata posterior en individuos provenientes de pozas con distintos niveles de desecación.

I Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M. y Méndez, M.A. 2009. Effects of pond drying on morphological and life history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research*, en prensa.

II Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M. y Méndez, M.A. Variación de atributos de historia de vida del anuro *Rhinella spinulosa* en respuesta a la desecación de las pozas: un experimento manipulativo de campo. En preparación.

## CONCLUSIONES

Las restricciones temporales del hábitat inducen variación fenotípica en atributos morfológicos y de historia de vida en *Rhinella spinulosa*. La plasticidad en el tiempo de desarrollo juega un rol fundamental para esta especie en la zona central del país, ya que le permite enfrentar la desecación inminente de las pozas temporales, evitando así mortalidades masivas.

Ambas aproximaciones experimentales aportaron información valiosa acerca de los factores que pueden ser importantes en el campo para la problemática en estudio. Entre estos, tanto la densidad de individuos como la calidad de la dieta, resultan puntos interesantes de evaluar en la generación de nuevas hipótesis, más realistas, para ser puestas a prueba en futuros estudios sobre esta especie.

## LITERATURA CITADA

- Abrams, P.A., Leimar, O., Nylin, S. y Wiklund, C. 1996. The effect of flexible growth rates on optimal sizes and development times in a seasonal environment. *American Naturalist*, **147**: 381-395.
- Addinsoft. 2005. XLSTAT-Pro Your data analysis solution. Software, version 2009.1.02. [www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)
- Altwegg, R. y Reyer, H.U. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, **57**: 872-882.
- Álvarez, D y Nicieza, G. 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology*, **16**: 640-648.
- Anholt, B.R., Negovetic, S. y Som, C. 1998. Methods for anaesthetizing and marking larval anurans. *Herpetological Review*, **29**: 153-154.
- Beck, C.W. 1997. Effect of changes in resource level on age and size at metamorphosis in *Hyla squirella*. *Oecologia*, **112**: 187-192.
- Beck, C.W. y Congdon, J.D. 2000. Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toads, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Functional Ecology*, **14**: 32-38.
- Berven, K.A. 1990. Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology*, **71**: 1599-1608.
- Benavides, A.G, Veloso, A., Jiménez, P. y Méndez, M.A. 2005. Assimilation efficiency in *Bufo spinulosus* tadpoles (Anura: Bufonidae): effects of temperature, diet quality and geographic origin. *Revista Chilena de Historia Natural*, **78**: 295-302.
- Blouin, M.S. y Loeb, M.L.G. 1991. Effects of environmentally induced development-rate variation on head and limb morphology in the green tree frog, *Hyla cinerea*. *American Naturalist*, **138**: 717-728.
- Blouin, M.S. y Brown, S.T. 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, **125**: 358-361.

- Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv. Genet.*, **13**: 115-155.
- Bradshaw, W.E. y Johnson, K. 1995. Initiation of metamorphosis in the pitcher-plant mosquito: effects of larval growth history. *Ecology*, **76**: 2055-2065.
- Brady, L.D. y Griffiths, R.A. 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the British anuran amphibians (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *J. Zool., Lond.*, **252**: 61-69.
- Crump, M.L. 1989. Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis. *Copeia*, **1989**: 794-797.
- Day, T. y Rowe, L. 2002. Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life-history transitions. *American Naturalist*, **159**: 338-350.
- Denver, R.J. 1997. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Am. Zool.*, **37**: 172-184.
- Denver, R.J., Mirhadi, N. y Phillips, M. 1998. An experimental analysis of adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: developmental response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology*, **79**: 1859-1872.
- Diamond, J. 1986. Overview: laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. En *Community Ecology* (J. Diamond y T.J. Case, eds.), pp. 3-22. New York: Harper & Row Publishers.
- Duellman, W. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill.
- Emerson, S.B. 1978. Allometry and jumping in frogs: helping the twain to meet. *Evolution*, **32**: 551-564.
- Emerson, S.B. 1985. Skull shape in frogs – correlations with diet. *Herpetologica*, **41**: 177-188.
- Emerson, S.B. 1986. Heterochrony and frogs: the relationship of a life history trait to morphological form. *American Naturalist*, **127**: 167-183.
- Ficetola, G.F. y De Bernardi, F. 2006. Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latastei*. *Evolutionary Ecology*, **20**: 143-158.
- Futuyma, D.J. y Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **19**: 207-233.



- Gervasi, S.S. y Foufopoulos, J. 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, **22**: 100-108.
- Goater, C.P., Semlitsch, R.D. y Bernasconi, M.V. 1993. Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. *Oikos*, **66**: 129-136.
- Gosner, N. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- Gotthard, K. 1998. Life history plasticity in the satyrine butterfly *Lasiommata petropolitana*: investigating an adaptive reaction norm. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**: 21-39.
- Gray, M.J. y Smith, L.M. 2005. Influence of land use on postmetamorphic body size of Playa Lake amphibians. *Journal of wildlife management*, **69**: 515-524.
- Grez, A.A. y Bustamante-Sánchez, M.A. 2006. Aproximaciones experimentales en estudios de fragmentación. En *Biodiversidad en Ambientes Fragmentados de Chile: Patrones y procesos a diferentes escalas* (A.A Grez, J.A Simonetti y R.O Bustamante, eds), pp. 17-40. Santiago: Editorial Universitaria.
- Henein, J.T. y Hammond, G. 1997. Antipredator behaviors of newly metamorphosed green frogs (*Rana clamitans*) and leopard frogs (*R. pipiens*) in encounters with eastern garter snakes (*Thamnophis s. sirtalis*). *Am. Midl. Nat.*, **137**: 136-144.
- Henschel, B.T. y Emlet, R.B. 2000. Metamorphosis of barnacle nauplii: effects of food variability and a comparison with amphibian models. *Ecology*, **81**: 3495-3508.
- Hulbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, **54**: 187-211.
- Imasheva, A.G. y Bublik, O.A. 2003. Quantitative variation of four morphological traits in *Drosophila melanogaster* under larval crowding. *Hereditas*, **138**: 193-199.
- Jiménez-Huidobro, P. 2008. Variación fisiológica y de atributos de historia de vida en función de la temperatura y procedencia geográfica en poblaciones chilenas de *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Johansson, F., Hjelm, J. y Giles, B.E. 2005. Life history and morphology of *Rana temporaria* in response to pool permanence. *Evolutionary Ecology Research*, **7**: 1025-1038.

- Kaplan, R.H. 1998. Maternal effects, developmental plasticity, and life history evolution. En *Maternal effects as adaptations* (T.E. Mousseau y C.W Fox, eds.), pp. 244–260. New York: Oxford University Press.
- Kohmatsu, Y., Shigeru, N. y Yamamura, N. 2001. Effects of head shape variation on growth, metamorphosis and survivorship in larval salamanders (*Hynobius retardatus*). *Ecological Research*, **16**: 73-83.
- Kupferberg, S. 1997. The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist*, **37**: 146-159.
- Laurila, A. y Kujasalo, J. 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J. Anim. Ecol.*, **68**: 1123-1132.
- Laurila, A., Karttunen, S. y Merilä, J. 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution*, **56**: 617-627.
- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press.
- Lind, M.I., Persbo, F. y Johansson, F. 2008. Pool desiccation and developmental thresholds in the common frog, *Rana temporaria*. *Proc. R. Soc. B.*, **275**: 1073-1080.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W. y Wolfinger, R.D. 1996. SAS system for mixed models. Cary, NC: SAS Institute.
- Loman, J. 1999. Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia*, **20**: 421-430.
- Loman, J. 2002. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *J. Zool., Lond.*, **258**: 115-129.
- Loman, J. y Claesson, D. 2003. Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: a test of cost models. *Evolutionary Ecology Research*, **5**: 179-194.
- Luebert, F. y Pliscoff, P. 2006. *Sinopsis Bioclimática y Vegetacional de Chile*. Santiago, Chile: Editorial Universitaria.
- Lutz, G.J. y Rome, L.C. 1994. Built for jumping: the design of the frog muscular system. *Science*, **263**: 370-372.
- McCollum, S.A. y Leimberger, J.D. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia*, **109**: 615-621.

- Méndez, M.A., Soto, E.R, Correa, C., Veloso, A., Vergara, E., Sallaberry, M. y Iturra, P. 2004. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, **77**: 559-567.
- Merilä, J., Laurila, A., Pakkala, M., Räsänen, K. y Timenes Laugen, A. 2000. Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *Rana temporaria*. *Ecosciencie*, **7**: 18-24.
- Moran, N.A. 1992. The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *American Naturalist*, **139**: 971-989.
- Morey, S.R. 1998. Pool duration influences age and body mass at metamorphosis in the western spadefoot toad: implications for vernal pool conservation. En *Ecology, Conservation, and Management of Vernal Pool Ecosystems – Proceedings from a 1996 Conference* (C.W. Witham, E.T. Bauder, D. Belk, W.R. Ferren Jr. y R. Ornduff, eds.), pp. 86-91. Sacramento: California Native Plant Society.
- Morey, S.R. y Reznick, D.N. 2004. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos*, **104**: 172-190.
- Mousseau, T.A. y Fox, C.W. 1998. *Maternal Effects as Adaptations*. New York: Oxford University Press.
- Newman, R.A. 1988. Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution*, **42**: 774-783.
- Newman, R.A. 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, **70**: 1775-1787.
- Newman, R.A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: what type of phenotypic variation is adaptive, and what are the costs of such plasticity. *BioScience*, **42**: 671-678.
- Newman, R.A. y Dunham, A.E. 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia*, **1994**: 372-381.
- Relyea, R.A. 2002. Local population differences in phenotypic plasticity: predator induced changes in wood frog tadpoles. *Ecol. Monogr.*, **72**: 77-93.
- Reznick, D.N. 1990. Plasticity in age and size at maturity in male guppies (*Poecilia reticulata*): an experimental evaluation of alternative models of development. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**: 185-203.

- Richter-Boix, A., Llorente, G.A. y Montori, A. 2006. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research*, **8**: 309-320.
- Roff, D.A. 1992. The evolution of life histories: theory and analysis. New York: Chapman & Hall.
- Row, C.L. y Dunson, W.A. 1995. Impacts of hydroperiod on growth and survival of larval amphibians in temporary ponds of Central Pennsylvania, USA. *Oecologia*, **102**: 397-403.
- Rowe, L. y Ludwig, D. 1991. Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology*, **72**: 413-427.
- Rudolf, V.H.W y Rodel, M.O. 2007. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under certain time constraints. *Evolutionary Ecology*, **21**: 121-142.
- Ruiz, G., Rosenmann, M. y Veloso, A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **94A**: 643-646.
- Schlichting, C.D. y Pigliucci, M. 1998. *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Semlitsch, R.D. 1987a. Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, **1987**: 61-69.
- Semlitsch, R.D. 1987b. Paedomorphosis in *Ambystoma talpoideum*: effects of density, food and pond drying. *Ecology*, **68**: 994-1002.
- Semlitsch, R.D. 2002. Critical elements for biologically based recovery plans of aquatic-breeding amphibians. *Conservation Biology*, **16**: 619-629.
- Semlitsch, R.D y Wilbur, H.M. 1988. Effects of pond drying time on metamorphosis and survival in the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, **1988**: 978-983.
- Semlitsch, R.D. y Reyer, H.U. 1992. Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interactions with pond drying and interspecific. *Evolution*, **46**: 665-676.
- Semlitsch, R.D., Scott, D.E. y Pechmann, J.H.K. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, **69**: 184-192.
- Skelly, D.K. y Werner, E.E. 1990. Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. *Ecology*, **71**: 2313-2322.

- Smirnov, S.V. 1992. The influence of variation in larval period on adult cranial diversity in *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae). *Journal of Zoology*, **226**: 601-612.
- StatSoft. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stearns, S.C. 1989a. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience*, **39**: 436-445.
- Stearns, S.C. 1989b. Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology*, **3**: 259-268.
- Stearns, S.C. 1992. The evolution of life histories. New York: Oxford University Press.
- Stevens, V.M., Polus, E., Wesselingh, R.A., Schtickzelle, N. y Baguette, M. 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Landscape Ecology*, **19**: 829-842.
- Sultan, S.E. y Spencer, H.G. 2002. Metapopulation structure favours plasticity over local adaptation. *American Naturalist*, **160**: 271-283.
- Tejedo, M. y Reques, R. 1994. Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: the interactive effects of density and pond duration. *Oikos*, **71**: 295-304.
- Van Buskirk, J. y Schmidt, B. R. 2000. Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, **81**: 3009-3028.
- Veloso, A. y Navarro, J. 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., Sallaberry, M., Navarro, J., Iturra, P., Valencia, J., Penna, M. y Díaz, N. 1982. Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. En *El hombre y los ecosistemas de montaña* (MAB 6), pp. 135-265. Santiago, Chile.
- Via, S. y Lande, R. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*, **39**: 505-522.
- Wassersug, R.J. 1997. Where the tadpole meets the world - Observations and speculations on biomechanical and biochemical factors that influence metamorphosis in anurans. *American Zoologist*, **37**: 124-136.
- Wassersug, R.J. y Sperry, D.G. 1977. The relationship of locomotion to differential predation rate on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology*, **58**: 830-839.

- Wassersug, R.J. y Hoff, K. 1982. Developmental changes in the orientation of the anuran jaw suspension: a preliminary exploration into the evolution of anuran metamorphosis. *Evol. Biol.*, **15**: 223-246.
- Werner, E.E. 1986. Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *American Naturalist*, **128**: 319-341.
- Whitlock, M.C. 1996. The red queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *American Naturalist*, **148**: S65-S77.
- Wilbur, H.M. 1980. Complex life-cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**: 67-93.
- Wilbur, H.M. 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology*, **68**: 1437-1452.
- Wilbur, H.M. y Collins, J.P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, **182**: 1305-1314.