



**PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN ANUROS PATAGÓNICOS DE LOS  
GÉNEROS *PLEURODEMA* Y *RHINELLA*: RESPUESTAS AL  
HIDROPERÍODO Y A LOS DEPREDADORES**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



AUTOR: LIC. FABIÁN GASTÓN JARA  
DIRECTORA: DRA. MARÍA G. PEROTTI  
CO-DIRECTORA: DRA. CARMEN A. ÚBEDA

San Carlos de Bariloche  
Junio de 2010

**TABLA DE CONTENIDOS**

Agradecimientos	iv
Resumen	vi
Abstract	x
Introducción General	1
<b>CAPÍTULOS</b>	
<b>I. Área de estudio e historia natural de las especies de anuros</b>	<b>9</b>
Aspectos generales del área de estudio	9
Humedales censados	9
Características físico-químicas de los humedales estudiados	19
Vegetación de los humedales	23
Historia natural de las especies de anuros estudiadas	26
<b>II. Respuestas del crecimiento, del desarrollo y de la metamorfosis de renacuajos de <i>Pleurodema</i> y <i>Rhinella</i> frente al hidroperíodo</b>	<b>32</b>
Introducción	32
Metodología	34
Trabajo de campo	34
Trabajo experimental	36
Preparación y acondicionamiento de los experimentos	36
Análisis estadísticos	39
Datos de campo	39
Datos de laboratorio	39
Resultados	40
Trabajo de campo	40
Reproducción	40
Desarrollo y crecimiento larvario	43
Peso de los metamorfos	51
Relaciones entre periodo larvario, peso de los metamorfos y permanencia del ambiente	55
Trabajo experimental	59
Especies de <i>Pleurodema</i>	59
<i>Rhinella spinulosa</i>	60
Índice de plasticidad fenotípica	64
Discusión	65
<b>III. Depredación de renacuajos de <i>Pleurodema</i> y <i>Rhinella</i> por insectos acuáticos</b>	<b>70</b>
Introducción	70
Metodología	73
Trabajo de campo	73
Ensamble de depredadores insectos, abundancias relativas y fenología	74
Ensamble de anuros	74

Trabajo experimental	75
Preparación y monitoreo del experimento	76
Análisis estadísticos	77
Resultados	77
Trabajo de campo	77
Riqueza y diversidad de especies de insectos depredadores	77
Presencia de especies de anuros en el área	78
Patron temporal de ocurrencia de los insectos depredadores	80
Abundancias relativas de depredadores	85
Trabajo experimental	91
Discusión	94
<b>IV. Modificaciones en la actividad de renacuajos de <i>Pleurodema</i> y <i>Rhinella</i> en respuesta a la presencia de insectos depredadores</b>	102
Introducción	102
Metodología	105
Preparación y monitoreo del experimento	105
Análisis estadísticos	108
Resultados	108
Discusión	112
<b>V. Efecto de <i>Rhionaeschna variegata</i> (Odonata: Anisoptera) sobre la morfología y el desarrollo de renacuajos de <i>Pleurodema</i> y <i>Rhinella</i></b>	120
Introducción	120
Metodología	124
Experimento 1: respuestas morfológicas y del desarrollo	125
Preparación y monitoreo del experimento	125
Modificaciones del experimento para <i>Rhinella spinulosa</i>	128
Análisis de las imágenes digitales	129
Experimento 2: desempeño o performance de la natación de los renacuajos	130
Experimento 3: supervivencia de los renacuajos	132
Análisis estadísticos	133
Desarrollo y crecimiento	133
Morfología	133
Desempeño en las carreras	134
Supervivencia	134
Resultados	135
Experimento 1	135
Desarrollo y crecimiento	135
Morfología	140
Experimento 2: desempeño o performance de la natación de los renacuajos	147
Experimento 3: supervivencia de los renacuajos	148
Discusión	151

<b>VI. Discusión general</b>	161
Lista de referencias	175
Apéndices	208
Apéndice I	208
Apéndice II	209
Apéndice III	213
Publicaciones	214

---

## AGRADECIMIENTOS

- A mis directoras de tesis Gabriela y Carmen que me han acompañado y dirigido en estos años, de las cuales he aprendido mucho en diferentes aspectos de la formación profesional como así también de las relaciones humanas.
- A todos mis compañeros de trabajo Daniela, Diego, Félix, Lina, Marina, Carolina, Claudia, Marcelo y Mariana de los que he aprendido mucho y hemos compartido muy gratos momentos a lo largo de estos 5 años.
- A Patricia Pérez y Patricia García por su colaboración en las salidas de campo y facilitarme los cultivos de algas.
- A María Diéguez por su colaboración en las salidas de campo y por toda la enseñanza que me brindó a lo largo de estos años.
- A María E. Cuello por su colaboración en las salidas de campo, facilitarme los data loggers y por sus consejos.
- Al Lic. M. Kum, Dr. J. Muzón, a la Dra. S. Mazucconi y al Dr. M. Archangelsky por la determinación de los insectos acuáticos y por la generosidad de compartir sus conocimientos y contestar todas mis inquietudes.
- A la Ing. Agr. C. Brion, Dra. C. Ezcurra, Dr. J. Puntieri y Dr. J. Grosfeld por la determinación de las plantas acuáticas.
- A la Dra. Nora Baccala por la asistencia en los análisis estadísticos.
- A la Administración de Parques Nacionales por otorgar los permisos correspondientes para trabajar en áreas del Parque Nacional Nahuel Huapi durante 2005-2008.
- A la Subsecretaria de Medioambiente de la Municipalidad de San Carlos de Bariloche por autorizar los muestreos realizados en la Laguna Fantasma.

- 
- Al Sr. Marcelo Botta por otorgarme la autorización para realizar muestreos en el Arroyo Bernal en áreas próximas al Aeropuerto de San Carlos de Bariloche.
  - A mi profesor y compañeros de teatro en donde encontré un refugio en momentos complicados.
  - A mi familia y amigos que siempre estuvieron a mi lado durante todos estos años de la licenciatura y del doctorado; y en especial a mi primer sobrino, Mateo, que recién comienza a dar sus primeros pasos.

El proyecto fue desarrollado en el Centro de Salmonicultura, Laboratorio de Fotobiología del Centro Regional Universitario Bariloche, UNCo-INIBIOMA (lugar de trabajo del director, Dra. M. G. Perotti) y en el Departamento de Zoología del Centro Regional Universitario Bariloche (lugar de trabajo del co-director, Dra. C. A. Úbeda). El desarrollo del presente trabajo fue financiado por el Conicet (Beca Doctoral) y por proyectos de investigación de la Universidad Nacional del Comahue y del CONICET.

---

## RESUMEN

La plasticidad fenotípica de los organismos en rasgos de la historia de vida, la conducta y la morfología está asociada en general, con ambientes que presentan alta heterogeneidad. Por ejemplo, muchos organismos acuáticos que habitan cuerpos de agua temporarios presentan a lo largo de su ontogenia rasgos que son altamente plásticos. Entre estos organismos, los anfibios han sido utilizados como modelo para muchos estudios de plasticidad fenotípica ya que responden rápidamente a variaciones ambientales. Dentro de los factores ambientales señalados como inductores del fenómeno de plasticidad se han citado, la duración del hidroperíodo, la temperatura, la competencia y la depredación. Por ejemplo, cuando el riesgo de mortalidad en el ambiente larvario incrementa, tanto por la desecación como por la depredación se ha observado que los anfibios son capaces de modificar su desarrollo, su conducta y su morfología. Estas respuestas han sido propuestas como adaptativas ya que incrementan por diferentes mecanismos la supervivencia de los individuos.

El noroeste de la Patagonia argentina se caracteriza por presentar una gran variedad de ambientes acuáticos que alberga una gran diversidad de especies, entre las que se encuentran los anfibios anuros. Entre las especies más comunes de la batracofauna de bosque de transición y de estepa se encuentran *Pleurodema thaul*, *Pleurodema bufoninum* y *Rhinella spinulosa* que, durante su desarrollo larvario, están expuestas a diferentes escenarios ambientales con una alta heterogeneidad respecto al hidroperíodo y a la composición de depredadores invertebrados que presentan.

En esta tesis se examina la plasticidad del desarrollo, del crecimiento, de la conducta y de la morfología de renacuajos de *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* por el efecto del hidroperíodo y de la depredación por invertebrados acuáticos.

El estudio se realizó sobre diferentes características de las larvas de estas tres especies de anuros tanto en condiciones naturales como experimentales, incluyendo el muestreo de

---

humedales con diferente hidroperíodo localizados en el Parque Nacional Nahuel Huapi y en el Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche, Provincia Río Negro.

De los muestreos en ambientes naturales se analizaron las variaciones en la composición de invertebrados depredadores, sus abundancias relativas, y sus patrones de colonización en cada humedal, mientras que para los anuros se determinaron diferentes variables del desarrollo y del crecimiento.

Los experimentos realizados tuvieron los siguientes objetivos: 1) evaluar el efecto del hidroperíodo sobre el desarrollo larvario, el crecimiento y el tamaño de los metamorfos simulando dos situaciones de hidroperíodo, 2) evaluar el efecto de diferentes depredadores sobre la supervivencia de los renacuajos, 3) evaluar la actividad de los renacuajos expuestos a presencia indirecta de depredadores, 4) determinar el efecto de náyades de odonatos sobre la morfología, desarrollo y crecimiento de los renacuajos, 5) evaluar si los cambios morfológicos inducidos por depredadores inciden en el desempeño (“performance”) medido a través de la velocidad de natación de los renacuajos, y finalmente, 6) analizar la supervivencia en renacuajos con y sin morfología inducida expuestos a depredadores.

En condiciones naturales las tres especies de anuros presentaron diferencias tanto en el desarrollo y el crecimiento larvario, como en el tamaño del metamorfo. Dichas diferencias estuvieron asociadas con el hidroperíodo de los humedales, observándose desarrollos larvarios más cortos y metamorfos más pequeños en humedales de hidroperíodos más cortos. Los humedales mostraron diferencias en la riqueza y abundancia relativa de los invertebrados depredadores, siendo los insectos acuáticos los depredadores dominantes en el área de estudio.

Los experimentos de laboratorio mostraron que los renacuajos de ambas especies de *Pleurodema* se desarrollaron más rápido y presentaron metamorfos más pequeños cuando fueron expuestos a una reducción en el volumen de agua. Por el contrario, *Rhinella spinulosa*



---

mostró un desarrollo más corto en el tratamiento de reducción de volumen de agua; sin embargo los metamorfos fueron de tamaño similar tanto en el tratamiento de volumen estable como variable.

La vulnerabilidad de los renacuajos a la depredación estuvo relacionada con la especie de anuro, el tamaño del renacuajo y la especie de depredador. Los renacuajos más pequeños fueron los más vulnerables a la depredación, y los depredadores de mayor talla fueron los más letales para las tres especies de anuros. Los renacuajos mostraron diferentes grados de palatabilidad, siendo los renacuajos de *Rhinella spinulosa* en estadios tempranos de la ontogenia los menos palatables para diferentes depredadores.

Los experimentos de comportamiento mostraron que la actividad de los renacuajos fue afectada por el tamaño del renacuajo y por la especie del depredador, observándose una reducción de la actividad frente a la presencia de diferentes insectos depredadores, siendo los renacuajos pequeños de *Pleurodema* los más sensibles a la presencia de estos depredadores.

Respecto a las respuestas morfológicas, solo los renacuajos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* mostraron cambios morfológicos cuando fueron expuestos a la presencia de náyades de odonatos. Las variables morfológicas que resultaron más plásticas frente a la presencia de estos depredadores fueron la altura de la aleta caudal y la altura del cuerpo. Experimentos posteriores sobre el rendimiento de estos morfos inducidos en *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum*, indicaron que estos cambios morfológicos no modifican las velocidades de natación de los renacuajos. No se observaron diferencias estadísticas en la supervivencia entre los renacuajos con morfologías inducidas y no inducidas, pero sí una tendencia de los renacuajos inducidos a presentar una mayor supervivencia. Aunque los resultados no fueron estadísticamente contundentes, las tendencias observadas deberían ser probadas considerando hipótesis alternativas (“lure effect”) de manera de evaluar si efectivamente los cambios inducidos en la morfología implican un mejor desempeño y conllevan a un aumento del

---

fitness de los organismos, pero a través de otros mecanismos o aspectos que no han sido considerados en este trabajo.

Como conclusión, las respuestas al hidroperíodo y a la depredación observadas en las tres especies de anuros estudiados, indicarían que estos factores son importantes, pudiendo afectar las dinámicas poblacionales de estos organismos y en última instancia la ecología de las comunidades que conforman.

---

## ABSTRACT

Phenotypic plasticity in an organism's life history, behavior and morphology is usually associated to highly heterogeneous environments. For example, many aquatic organisms that live in temporary water bodies have features that are highly plastic throughout their ontogeny. Among these, amphibians have been used as a model for many studies of phenotypic plasticity because they respond rapidly to environmental change. Hydroperiod, temperature, competition and predation, among other factors, have been cited as inducing plasticity. For example, it has been found that when the risk of mortality in the larval environment increases due to either predation or desiccation, amphibians are able to alter their development, behavior and morphology. These responses have been proposed as adaptative because they increase individual survival by means of different mechanisms.

The north-west Argentine Patagonia is characterized by a wide range of aquatic environments where many different species live, including anuran amphibians. Among the most common species of amphibians in the transition forest and steppe are *Pleurodema thaul*, *Pleurodema bufoninum* and *Rhinella spinulosa*. During their larval development, they are exposed to different environmental scenarios with highly heterogeneous hydroperiods and compositions of invertebrate predators.

This thesis examines plasticity of development, growth, behavior and morphology of *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* and *Rhinella spinulosa* tadpoles due to the effect of hydroperiod and predation by aquatic insects.

Different characteristics of the tadpoles of these three anuran species were studied under both natural and experimental conditions, including sampling of wetlands with different hydroperiods in the Nahuel Huapi National Park and the surroundings of San Carlos de Bariloche city, in Río Negro Province.

---

The samples taken from natural environments were used to study the variations in the composition, relative abundance and colonization patterns of insect predators in each wetland, and to determine different variables of development and growth for the anurans.

Experiments were performed with the following aims: (1) to assess the effect of hydroperiod on larval development, growth and size of metamorphs by simulating two different hydroperiod situations, (2) to assess the effect of different predators on tadpole survival, (3) to assess the activity of tadpoles exposed to the indirect presence of predators, (4) to determine the effect of odonate naiads on tadpole morphology, development and growth, (5) to assess whether the morphological changes induced by predators affect tadpole performance as measured by swimming speed and (6) to analyze the fitness of tadpoles with and without induced morphology when exposed to predators.

Under natural conditions, the three anuran species showed differences in larval development and growth as well as metamorph size. These differences were associated with the hydroperiod in the wetlands, and shorter larval development and smaller metamorphs were found in wetlands with shorter hydroperiods. There were differences in richness and relative abundance of aquatic insects among different wetlands, being the dominant predators in the study area.

The laboratory experiments showed that the tadpoles of both *Pleurodema* species developed faster and had smaller metamorphs when exposed to a reduction in the volume of water. In contrast, *Rhinella spinulosa* had shorter development time in the treatment in which water volume was reduced; nevertheless the metamorphs were similar in size for both the stable and variable water volume treatments.

Tadpole vulnerability to predation was related to anuran species, tadpole size and predator species. The smallest tadpoles were the most vulnerable to predation, and the largest predators were the most efficient in killing the three anuran species. Tadpoles were found to

---

have different degrees of palatability, with early ontogenic stages of *Rhinella spinulosa* being the least palatable to different predators.

The experiments on behavior showed that tadpole activity was affected by tadpole size and predator species, with a reduction in activity when tadpoles were exposed to the presence of different insect predators. Small *Pleurodema* tadpoles were the most sensitive to the presence of these predators.

Regarding morphological responses, only *Pleurodema thaul* and *P. bufoninum* tadpoles showed morphological changes when exposed to the presence of odonate naiads. Caudal fin height and body height were the most plastic morphological variables in the presence of these predators. Subsequent experiments showed that the performance of these *Pleurodema thaul* and *P. bufoninum* induced morphs were not related to increased tadpole swimming speed. Additionally, no statistical difference in survival was found between tadpoles with induced and non-induced morphology, although there was a trend towards greater survival in induced tadpoles. Although the results were not statistically conclusive, these trends should be tested considering alternative hypotheses (“lure effect”) in order to assess whether in fact induced changes in morphology imply better performance, including increased fitness, due to other mechanisms or aspects that were not considered in this study.

To conclude, the responses to hydroperiod and predation of the three anuran species studied appear to indicate that these factors are important in modeling their dynamics and ultimately the ecology of the communities they belong to.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La heterogeneidad ambiental, tanto espacial como temporal es uno de los factores más importantes responsable de la diversificación de las poblaciones y en última instancia de la especiación (Brockhurts *et al.*, 2004). Dicha heterogeneidad ambiental, asociada tanto con factores bióticos como abióticos, es responsable de diferentes adaptaciones en los organismos (Wilbur, 1987; Newman, 1988 a y b, 1992; 1998; Denver, 1997 a y b; Serra *et al.*, 2003; DeWitt & Langerhans, 2004; Fordyce, 2006). Estos factores ambientales tienen una gran influencia sobre características de la historia de vida (todos aquellos rasgos asociados al ciclo de vida de un individuo) de los organismos pudiendo alterar tanto el desarrollo, como el crecimiento y la reproducción (Roff, 1992; Stearns, 1992; Jannot *et al.*, 2008). La heterogeneidad ambiental representa un factor de cambio para el desarrollo de los organismos ya que las condiciones del hábitat y los niveles de los recursos determinan los niveles de crecimiento y las tasas de diferenciación durante el desarrollo (Hentschel, 1999; Dmitriew & Rowe, 2005). Algunos organismos poseen la capacidad de modificar su fisiología, comportamiento y morfología, para reducir un posible efecto negativo del cambio ambiental sobre el “fitness” o eficacia biológica del organismo. Durante el desarrollo los tejidos que constituyen a los organismos son rápidamente generados y alterados, por lo tanto pequeños cambios en el ambiente ontogenético pueden resultar en marcados cambios en diferentes caracteres del fenotipo produciendo efectos a largo plazo sobre la eficacia biológica (Scott, 1994; Desai & Hales, 1997; Downes & Shine, 1999; Thompson, 1999).

Dentro de las muchas adaptaciones que han desarrollado los organismos para poder hacer frente a la variabilidad ambiental se han propuesto cuatro tipos de estrategias (DeWitt & Langerhans, 2004): especialización, generalización, “bet-hedging” o apuesta diversificada, y plasticidad fenotípica. La distinción entre estas estrategias está relacionada con la producción

de fenotipos: un organismo adopta un único fenotipo (especialistas y generalistas) o varios fenotipos distintos (plasticidad y “bet-hedging”) (DeWitt & Langerhans, 2004). La diferencia entre plasticidad y “bet-hedging” consiste en que en el caso de plasticidad los organismos se expresan con diferentes fenotipos frente a la variación del ambiente, mientras que los organismos que emplean las estrategias del tipo “bet-hedging” siempre expresan diferentes fenotipos, pero alguno de ellos será óptimo de acuerdo a la circunstancia ambiental del momento (DeWitt & Langerhans, 2004).

Una población que habita un ambiente heterogéneo (espacial o temporal) debería evolucionar a una constitución genética que le permita una variabilidad fenotípica para que de esta manera pueda incrementar su fitness (supervivencia y reproducción) bajo condiciones impredecibles (Zhivotovsky *et al.*, 1996). Muchos organismos que habitan ambientes heterogéneos muestran plasticidad fenotípica en diferentes rasgos de sus historias de vida, morfología y comportamiento que están asociados al “fitness” o eficacia biológica (Roff, 1992; Stearns, 1992). La plasticidad fenotípica es generalmente definida como la propiedad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Pigliucci *et al.*, 2006). Un mismo genotipo puede alterar su química, fisiología, desarrollo, morfología o conducta en respuesta a determinadas señales del ambiente que habita (Agrawal, 2001). Todo rasgo plástico está regulado genéticamente, puede o no ser heredable y responde a la selección (Zhivotovsky *et al.*, 1996; DeWitt & Scheiner, 2004; Relyea, 2005). Las respuestas plásticas de los organismos a la variación ambiental pueden ser mantenidas a través de la selección natural y es esperable que tengan un efecto importante sobre las poblaciones y comunidades (McPeck, 1996; Werner & Anholt, 1996; Dayton & Fitzgerald, 2001; Miner *et al.*, 2005).

La plasticidad fenotípica ha sido demostrada en un gran número de organismos, desde plantas hasta animales (Schlichting, 1986; Stearns, 1989; DeWitt & Schneider, 2004).

Muchas de las observaciones han sido realizadas en organismos acuáticos, en particular en aquellos que presentan ciclos de vida complejos (Crowl & Covich, 1990; Peckarsky *et al.*, 1993; Johansson, 2002; Benard, 2004). Los organismos con ciclos de vida complejos son particularmente interesantes para examinar las implicancias de la plasticidad fenotípica sobre rasgos de la historia de vida en ambientes variables. En estos organismos el proceso de metamorfosis involucra cambios que ocurren desde uno o varios estadios larvarios hacia un estadio adulto. La plasticidad en el crecimiento y el desarrollo influencia tanto el tiempo a la metamorfosis como así también el tamaño a la metamorfosis en insectos (Nylin *et al.*, 1989; Bradshaw & Jonson, 1995; Blanckenhorn, 1998; Gotthard, 1998; Johansson *et al.*, 2001; Gervasi & Foufopoulos, 2008), crustáceos (Twombly, 1996; Hentschel & Emlet, 2000; Gervasi & Foufopoulos, 2008), peces (Reznick, 1990; Gervasi & Foufopoulos, 2008) y anfibios (Wilbur & Collins, 1973; Wilbur, 1980; Pfennig *et al.*, 1991; Rowe & Ludwig, 1991; Newman, 1992; Morey & Reznick, 2000, 2004; Rudolf & Rodel, 2007; Gervasi & Foufopoulos, 2008 ).

La biota asociada a ambientes acuáticos temporarios se caracteriza por presentar un gran número de especies con ciclos de vida complejos (Schneider & Frost, 1996; Williams, 1996 a y b). Entre estas especies se encuentran insectos y anfibios (Williams, 1987; Wilbur, 1997; DeWitt *et al.*, 1999).

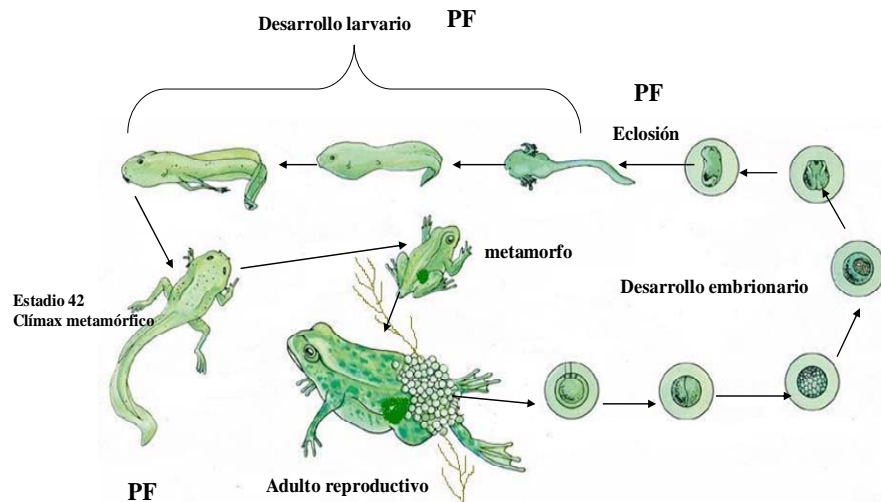
Los anfibios han sido empleados como modelos para el estudio de plasticidad fenotípica debido a que presentan una gran variedad de respuestas plásticas cuando son expuestos a diferentes situaciones ambientales (*e.g.* Newman, 1988 a y b; Crump, 1989; Loman, 1999; Eklöv, 2000; Warkentin, 2000; Relyea, 2001 a y b; Benard, 2004; Richardson, 2006). La mayoría de los estudios se centran en el estadio de embrión y de larva o renacuajo, estadios del ciclo vida que han mostrado plasticidad en diferentes características historia de vida (duración del período larvario y tiempo en completar la metamorfosis), morfología y



conducta; y dicha plasticidad responde tanto a variables abióticas y bióticas del ambiente (Fig. 1) (Relyea, 2001 a y b, 2002, 2003; Van Buskirk, 2002; Vences, *et al.*, 2002; Van Buskirk *et al.*, 2003; Benard, 2004; McIntyre *et al.*, 2004). Sin embargo la mayoría de los estudios sobre plasticidad fenotípica se basan en pocos géneros de algunas familias distribuidos en el Hemisferio Norte y Centro América (*Rana*, *Hyla*, *Bufo*, *Scaphiopus*, *Pseudacris*, *Agalychnis*, *Phyllomedusa*, *Hyperolius*, *Crinia*, *Limnodynastes*, *Pelodytes*, *Alytes* entre otros) (Relyea, 2001 a y b; Richardson, 2001; Lane & Mahoney, 2002; Vonesh, 2003; Benard, 2004; Kraft *et al.*, 2006; Richter-Boix *et al.*, 2006).

Dentro de los factores ambientales señalados como inductores del fenómeno de plasticidad en los anfibios se han citado la duración del hidroperíodo, la temperatura, la competencia y la depredación (Newman, 1988; Patterson & McLachlan, 1989; Loman, 1999; Relyea, 2001, 2002, 2003; Richardson, 2001; Benard, 2004; Richter-Boix *et al.*, 2006; Schoeppner & Relyea, 2008; Takahara *et al.*, 2008 a y b; Kehr & Gómez, 2009).

Figura 1. Etapas del ciclo vital de un anfibio típico en donde se muestran los diferentes estadios del ciclo de vida en donde se ha observado plasticidad fenotípica (PF). Extraído y modificado de [www.ebrisa.com](http://www.ebrisa.com).



Cuando el riesgo de mortalidad en el ambiente larvario incrementa tanto por la desecación o como por la depredación, se favorece una edad temprana a la metamorfosis a expensas de un tamaño corporal pequeño (Wilbur, 1987; Newman, 1988 a y b, 1992; Crump, 1989; Denver, 1997 a y b; Laurila & Kujasalo, 1999; Loman, 1999; Morey & Reznick, 2000; Loman & Claesson, 2003; Merila *et al.*, 2004; Rudolf & Rodel, 2007). Esta respuesta claramente beneficia al organismo permitiéndole realizar un cambio de nicho (acuático a terrestre) antes de que la charca se seque o bien antes de que sea depredado.

Las respuestas plásticas de los organismos al ambiente también conllevan costos. Los costos de plasticidad fueron clasificados como costos de manutención, de producción, de adquisición de información, de inestabilidad del desarrollo y genéticos (ligamiento,

pleiotropía, epistasis) (DeWitt *et al.*, 1998). Estos costos asociados a la plasticidad fenotípica han sido estudiados por algunos autores y aunque juegan un rol central en las teorías evolutivas, es poco lo que se ha profundizado sobre el tema hasta el momento (Scheiner & Berrigan, 1998; Relyea, 2002; Van Buskirk, 2002; Richter-Boix *et al.*, 2006; Steiner & Van Buskirk, 2008). Los costos se traducen en una reducción en la eficacia biológica (“fitness”) de los organismos plásticos respecto de los que no lo son, en ausencia del factor disparador del cambio (DeWitt *et al.*, 1998; Agrawal, 2001). Por ejemplo, algunos trabajos empíricos han demostrado que aquellos organismos que cambian su comportamiento o modifican su morfología (defensas inducidas) por efecto de la depredación, conllevan costos (Benard, 2004); éstos podrían estar asociados a un retraso en la madurez sexual (Smith, 1987), una disminución en la fecundidad (Howard, 1980; Berven, 1981), o una disminución de la supervivencia en la fase adulta (Berven & Gill, 1983; Black & Dodson, 1990; Skelly & Werner, 1990; Peckarsky *et al.*, 1993; Van Buskirk *et al.*, 1997; Morey & Reznick, 2000; Altwegg & Reyer, 2003).

En los siguientes capítulos se examinará la plasticidad fenotípica en tres especies de anuros del noroeste de la Patagonia Argentina, *Pleurodema thaul* (Lesson, 1826) (Anura: Leiuperidae), *Pleurodema bufoninum* Bell, 1843 (Anura: Leiuperidae) y *Rhinella spinulosa* Philippi, 1902 (Anura: Bufonidae). Estas especies se reproducen en primavera en diferentes tipos de humedales, la mayoría de ellos temporarios (Jara, 2002; Weigandt *et al.*, 2004; Jara *et al.*, 2006; Jara & Perotti, 2006, 2009). Este tipo de ambientes presenta una alta heterogeneidad ambiental, tanto espacial como temporal en cuanto a los factores abióticos y bióticos. La duración del hidroperíodo y el riesgo de depredación son dos factores con una marcada heterogeneidad y por ello serán el eje de este estudio. Nuestro objetivo central será analizar si estas especies de anuros exhiben cierto grado de plasticidad fenotípica en características de su historia de vida, conducta y morfología frente a estos factores

ambientales, que parecen ser los principales responsables en modelar estas comunidades acuáticas. Por lo tanto la hipótesis general que se plantea es que las especies de anuros *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* presentan plasticidad en características de la historia de vida, del comportamiento y de la morfología, como respuestas al hidroperíodo y a la depredación.

En el CAPÍTULO I se realizará una descripción general del área de estudio y se describirán aspectos de la biología de las especies de anuros de la zona. El área de estudio está localizada en el Parque Nacional Nahuel Huapi y el Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche. Se describirán los humedales en estudio, a través de variables morfométricas, físico-químicas y biológicas.

En el CAPÍTULO II se examinarán las respuestas en el crecimiento, desarrollo y metamorfosis de los anuros frente al hidroperíodo. Teniendo en cuenta que las especies de anfibios estudiadas habitan humedales con diferentes hidroperíodos, se estudiará la plasticidad inducida a través de la medición de variables como el crecimiento y el desarrollo en sus ambientes naturales. También se examinará de forma experimental si las especies responden a una reducción en el volumen de agua midiendo variables como el crecimiento y la edad a que alcanzan la metamorfosis, ambos rasgos ligados al “fitness” o eficacia biológica del individuo.

En el CAPÍTULO III en condiciones naturales se estudiará la composición y abundancias relativas de los depredadores insectos, su distribución de tallas y los procesos de colonización en los cuerpos de agua a lo largo de su hidroperíodo. En condiciones experimentales, se medirá la supervivencia de los renacuajos de diferentes tamaños frente a depredadores insectos de las cuatro especies más comunes en el área de estudio.

En el CAPÍTULO IV se analizará la capacidad de respuesta comportamental de los renacuajos a la presencia de sus depredadores insectos más frecuentes en el área. Bajo

condiciones experimentales se medirá la tasa de actividad, ya que es una variable intimamente ligada al fitness del organismo y además es una de las respuestas inducidas que ha sido más estudiada en los anfibios.

En el CAPÍTULO V se analizarán en condiciones experimentales, las posibles respuestas morfológicas, del desarrollo y del crecimiento de los renacuajos expuestos a náyades de *Rhionaeschna variegata* (Odonata: Aeshnidae), el depredador invertebrado tope de los humedales estudiados.

Finalmente en el CAPÍTULO VI se realizará una integración de todos los aspectos abordados en los capítulos precedentes.

## CAPÍTULO I

## ÁREA DE ESTUDIO E HISTORIA NATURAL DE LAS ESPECIES DE ANUROS

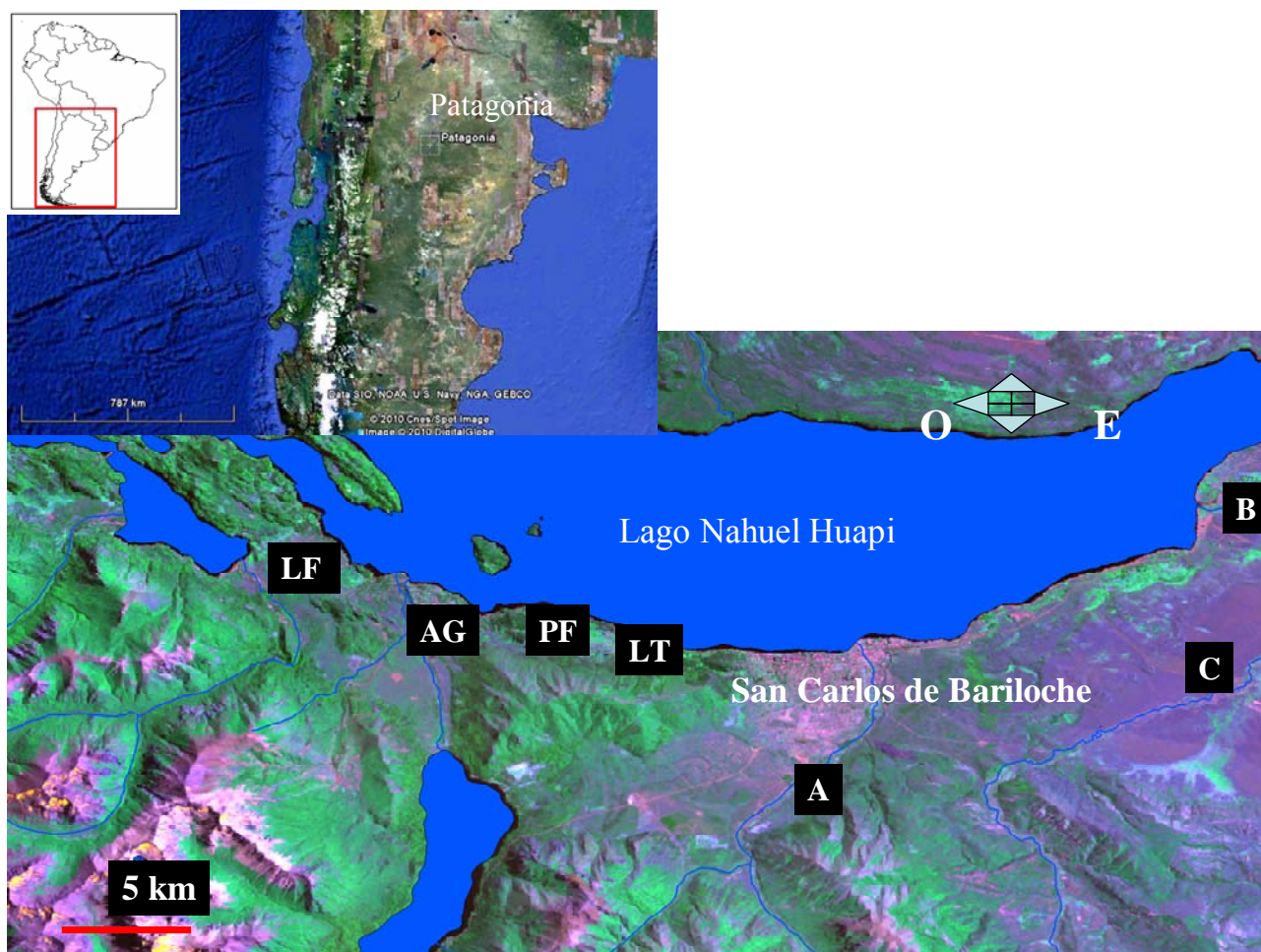
**Aspectos generales del Área de estudio**

Los humedales bajo estudio están ubicados en la Provincia de Río Negro al Noroeste de la Patagonia Argentina. Están situados en el Parque Nacional Nahuel Huapi y en el Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche (Fig. 1). Dentro del área existe una gran variedad de humedales que comprenden desde grandes lagos (como el Lago Nahuel Huapi) hasta humedales temporarios como mallines y lagunas (Iriondo, 1989; Zagarese *et al.*, 1999; Perotti *et al.*, 2005). La mayoría de los humedales monitoreados son temporarios y su hidroperíodo se extiende desde el comienzo de las lluvias otoñales hasta comienzos del verano. Todos los humedales se encuentran dentro de un gradiente ambiental (bosque-estepa) determinado por las precipitaciones decrecientes de oeste-este (Iriondo, 1989). Estos ambientes fueron seleccionados por que son humedales que los anuros utilizan para la reproducción y el desarrollo, y por que presentan una gran variabilidad en cuanto a su hidroperíodo y a la composición de invertebrados depredadores, siendo los insectos acuáticos los principales depredadores tope.

**Humedales censados**

Los humedales estudiados se sitúan en 7 localidades: Arroyo Bernal, Río Ñirihuau, Arroyo Ñireco, Laguna Teleférico, Laguna Fantasma, humedal Pinar de Festa y Arroyo Gutierrez.

Figura 1. Localización de los humedales muestreados. A: Localidad Arroyo Ñireco (4 humedales), B: localidad del Río Ñirihuau (4 humedales), C: localidad del Arroyo Bernal (6 humedales), LF: Laguna Fantasma, AG: Arroyo Gutiérrez, PF: Pinar de Festa y LT: Laguna Teleférico. Tomado de SIB Parques Nacionales, Sistema de Información de Biodiversidad [www.sib.gov.ar](http://www.sib.gov.ar)



1. *Humedales de la localidad del Arroyo Bernal.*

Comprenden 6 humedales temporarios que se forman a partir del mes de septiembre en depresiones y antiguos cauces próximos al arroyo Bernal (41° 08' S, 71° 11' O) (Fig. 2) y se encuentran entre los 837 y 844 ms.n.m. Presentan forma irregular, con tamaños entre 15 y 556 m<sup>2</sup> de superficie, cuyas profundidades máximas varían entre 0.3 y 1.7 m. Se encuentran completamente expuestos a la radiación solar, rodeados por una vegetación de estepa patagónica. Los fondos de estos humedales están constituidos por rocas redondeadas y sedimento fino. Poseen poca vegetación acuática, con predominio de heleófitas (mayormente gramíneas).



Figura 2. Humedales de la localidad del Arroyo Bernal.



## 2. Humedales de la localidad del Río Ñirihuau.

Comprende 4 humedales temporarios (con hidroperíodos más largos que los de la localidad anterior), próximos a la desembocadura del Río Ñirihuau en el lago Nahuel Huapi ( $41^{\circ} 05'S$ ,  $71^{\circ} 10'O$ ; 771 ms.n.m.). Incluyen tres mallines y una laguna pequeña (Fig. 3) rodeados por matorral de ñire, *Nothofagus antarctica*, y de rosa mosqueta, *Rosa rubiginosa*. Además está presente el sauce exótico, *Salix fragilis*. Los mallines poseen fondos de sedimento fino y presentan agua con gran cantidad de materia orgánica que torna sus aguas poco transparentes. La laguna (humedal 3) presenta forma semilunar y se forma en un brazo abandonado por desborde del río. Tiene fondo rocoso y agua transparente. Todos los humedales poseen vegetación acuática dominada por plantas heleófitas (juncos y gramíneas).

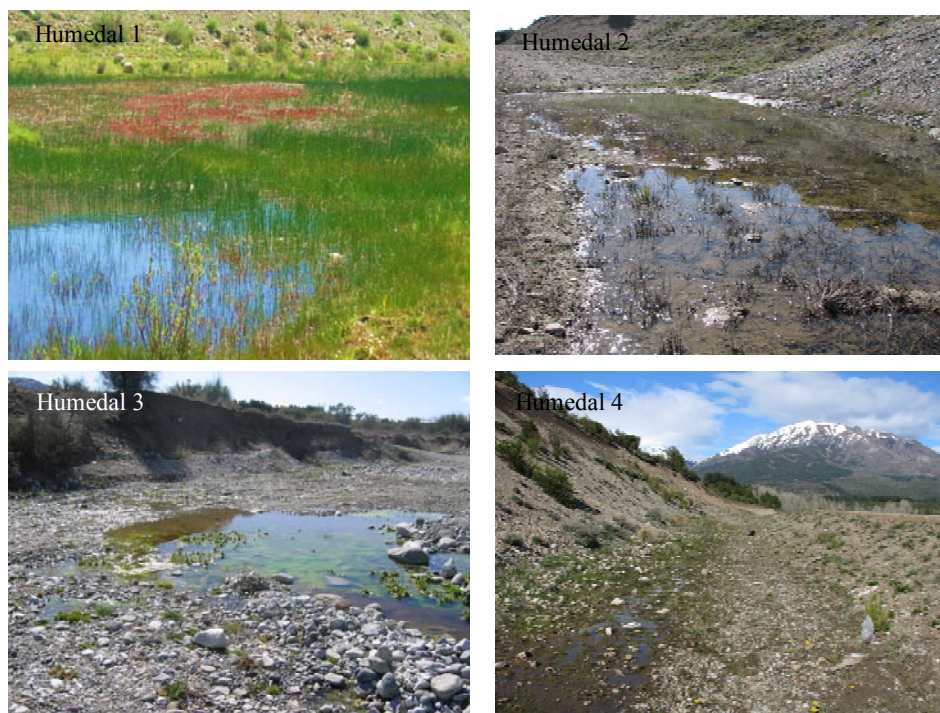
Figura 3. Humedales de la localidad del Río Ñirihuau.



### 3. Humedales de la localidad del Arroyo Ñireco.

Los ambientes se sitúan próximos al arroyo Ñireco ( $41^{\circ} 10.8'S$ ,  $71^{\circ} 19.2'O$ ; 906 ms.n.m) y están ubicados en las proximidades de la ruta 40. Se estudiaron cuatro humedales, tres de ellos en depresiones artificiales y una charca de desborde paralela a la ruta (Fig. 4). Dentro de los humedales en depresiones artificiales, el denominado humedal 1 es de tipo permanente y recibe el agua de una pequeña vertiente y de un cauce secundario del arroyo. Su fondo es de sedimento fino y rocas redondeadas. Es el ambiente con mayor complejidad estructural debido a la diversa vegetación acuática presente. Los otros ambientes corresponden a humedales temporarios cuyo hidropériodo se extiende hasta finales de la primavera; dos de ellos poseen fondos con sedimento fino (humedales 2 y 4) y el restante (humedal 3) corresponde a una charca de desborde que presenta fondo rocoso. Estos últimos humedales no tienen vegetación acuática o bien es escasa.

Figura 4. Humedales de la localidad del Arroyo Ñireco.



#### 4. Humedales dentro del ejido Municipal de San Carlos de Bariloche

*Laguna Fantasma*: este humedal se encuentra sobre la Avenida Bustillo a 14 km al oeste de la ciudad de San Carlos de Bariloche ( $41^{\circ} 05'S$ ,  $71^{\circ} 27'O$ ; 794 ms.n.m.). Es una laguna temporaria de forma circular con un área de aproximadamente  $8000 \text{ m}^2$  (Fig. 5). Su hidroperíodo se extiende desde las primeras lluvias otoñales (mayo-junio) hasta el verano (enero-febrero) dependiendo de las precipitaciones de cada año. Se sitúa en un ambiente típicamente boscoso altamente modificado por la creciente urbanización, rodeado por algunos ejemplares de *Austrocedrus chilensis*, *Lomatia hirsuta* y arbustos de *Rosa rubiginosa*. Su fondo es de sedimento fino, cubierto de vegetación acuática arraigada (heleófitas e hidrófitas, Tabla II).

Figura 5. Laguna Fantasma.



*Humedal Pinar de Festa*: este humedal se encuentra a 6 km al oeste de la ciudad de San Carlos de Bariloche, sobre la Avenida de Los Pioneros (41° 7' 31.81"S, 71° 23' 6.68"O; 830 ms.n.m.). Es un pastizal húmedo con depresiones inundables (Fig. 6). Recibe el aporte de agua de una vertiente, por lo que ciertas partes del pastizal permanecen con agua durante todo el año.

Figura 6. Humedal Pinar de Festa.



*Laguna Teleférico*: este humedal se encuentra a 5 km al oeste de San Carlos de Bariloche sobre la Avenida de Los Pioneros (41° 7' 40.00"S, 71° 22' 6.00"O; 816 ms.n.m.). Es una pequeña laguna circular cuyo hidroperíodo se extiende desde las primeras lluvias otoñales hasta fines de Febrero (Fig. 7). Su fondo es de sedimento fino, cubierto de plantas hidrófitas (principalmente *Miriophyllum quitense*) y heleófitas (juncos y gramíneas).

Figura 7. Laguna Teleférico.



*Arroyo Gutiérrez*: este humedal se encuentra a 13 km de San Carlos de Bariloche, sobre la Ruta Provincial 82 ( $41^{\circ} 8' 0.11''\text{S}$ ,  $71^{\circ} 24' 51.49''\text{O}$ ; 801 ms.n.m.). Es un humedal permanente formado en la llanura de inundación del Arroyo Gutiérrez (Fig. 8). La profundidad fluctúa de acuerdo al nivel del arroyo; tiene márgenes colonizados por sauces exóticos (*Salix fragilis*). El fondo está compuesto de sedimento fino y rocas, donde se arraigan gramíneas y juncos (Tabla II).

Figura 8. Arroyo Gutiérrez.



**Características físico-químicas de los humedales estudiados.**

Los ambientes muestreados son someros y la profundidad máxima no supera los 2 metros. Hay diferencias marcadas en los valores de pH, oxígeno disuelto, temperatura y sólidos disueltos en los diferentes humedales (Tabla I). Los valores de pH tienden a ser levemente alcalinos hacia el final del hidropériodo en los humedales temporarios. Los valores de sólidos disueltos tienden a incrementarse hacia finales del hidropériodo en los humedales temporarios. En general, el patrón de temperaturas a lo largo de los meses fue similar en todos los humedales, observándose un incremento gradual con el avance de la primavera y el verano. Las temperaturas diurnas del agua registradas en los meses de septiembre a enero fueron variables en todos los humedales (8,1-30 °C) (Tabla I). Las temperaturas más altas fueron registradas en el mes de diciembre, en humedales muy efímeros y someros como los de la localidad Arroyo Bernal y los humedales 2 y 3 de la localidad Arroyo Ñireco (Tabla I).

Las temperaturas medias a lo largo del día mostraron que humedales muy someros y efímeros como el humedal 5 de la localidad Arroyo Bernal experimentaron una gran oscilación diaria con temperaturas que fluctuaron entre los 4 °C en la mañana y los 25 °C por la tarde (Fig. 9). Los humedales más profundos y de mayor hidropériodo (humedal 1 de la localidad Río Ñirihuau) mostraron temperaturas poco fluctuantes y más cálidas, mientras que humedales permanentes (humedal del Arroyo Gutiérrez, humedal 1 de la localidad Arroyo Ñireco) presentaron también temperaturas poco fluctuantes pero más frías que los humedales temporarios (Fig. 9).



Figura 9. Temperaturas horarias registradas durante diciembre de en cuatro humedales del área de estudio. Los valores representan las medias  $\pm$  ES de datos registrados en cuatro días consecutivos. Los datos fueron tomados cada una hora mediante un data-logger colocado a 30 cm de profundidad.

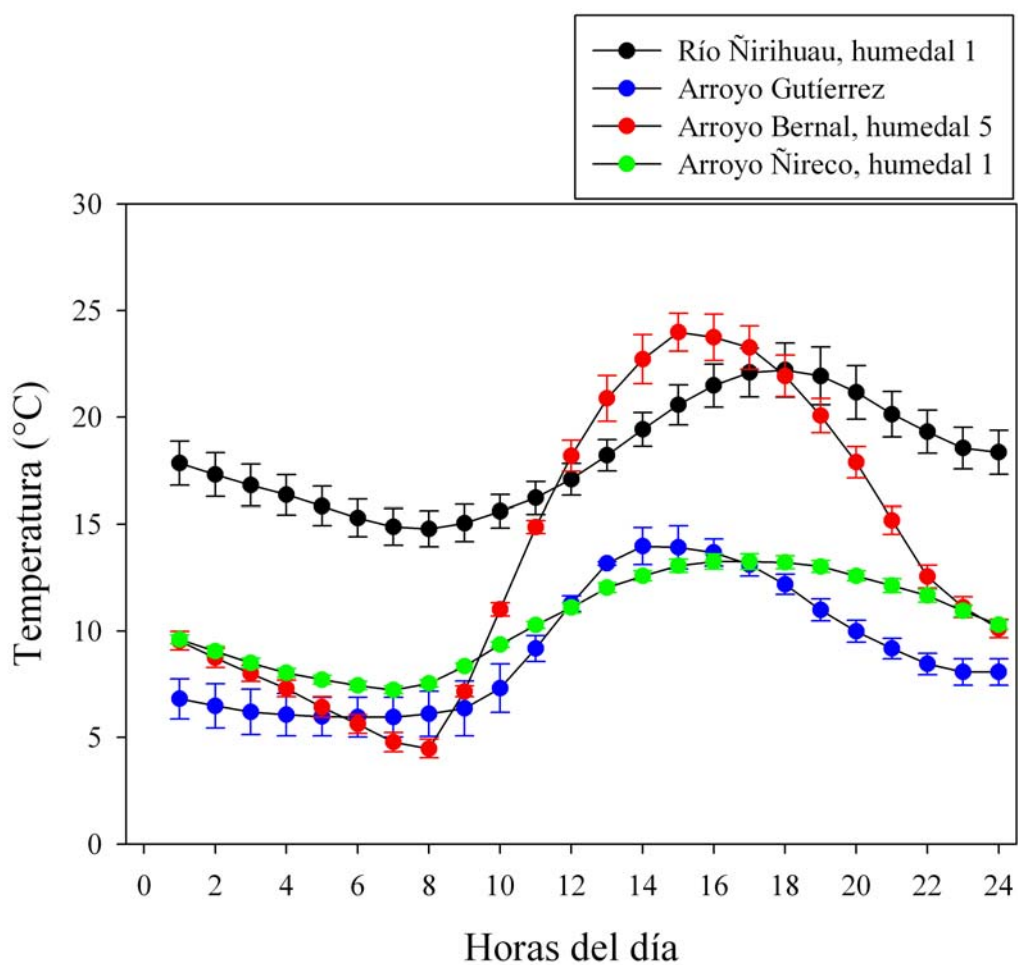


Tabla I. Variables morfométricas, físicas y químicas de los humedales monitoreados durante primavera-verano de los años 2005, 2006 y 2007. Los datos corresponden a los máximos y mínimos registrados en el intervalo horario de 10:00 a 14:00 hrs. El área y la profundidad corresponden al área máxima y a la profundidad máxima de cada humedal. Los datos representan valores registrados en la parte mas profunda de cada laguna. TDS: sólidos disueltos totales.

<b>Localidad</b>	<b>Humedal</b>	<b>Período de muestreo</b>	<b>Tipo de humedal</b>	<b>Área (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Profundidad (m)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Oxígeno disuelto (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>TDS (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conductividad (μS cm<sup>-1</sup>)</b>
Arroyo Bernal	1	SEP-DIC 05	temporario	556	0,38	8-30	6,24-8,25	7,9-8,3	19-60,2	54,1-86,1
	2	SEP-DIC 05	efimero	234	0,45	13,5-28,5	-----	7,3-8,8	12-18	22-36,8
	3	SEP-DIC 05	efimero	543	0,46	13,6-30	6,36-7,5	7,2-9,4	12-87,7	31,6-124,1
	4	SEP-DIC 05	efimero	87	0,4	9-26,5	6-7,5	7,3-9,9	25-54	53,4-112,9
	5	SEP-DIC 05	efimero	33	0,3	19-28,8	-----	7,1-9,6	25-35	52,5-68,5
	6	SEP-DIC 05	efimero	15	0,4	18-25,5	8-8,25	7,7-9	31-60,2	70,5-98,3
Río Ñirihuau	1	SEP-DIC 05	temporario	1.000	0,7	8,7-26,5	6,5-7,8	6,1-9,5	33-77,8	65,15-91,15
	2	SEP-DIC 05	temporario	6.837	0,6	12,73-25	6,66-7,75	6-8	26,5-61	63,1-129,33
	3	SEP-DIC 05	temporario	15,1	0,6	13,17-24	7,14	6-7,5	39-75,3	81,9-108,1
	4	SEP-DIC 05	temporario	651,5	0,5	17-30,5	7,48	7,45-8,05	28-50,1	58,7-80,3

<b>Localidad</b>	<b>Humedal</b>	<b>Período de muestreo</b>	<b>Tipo de humedal</b>	<b>Área (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Profundidad (m)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Oxígeno disuelto (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>TDS (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conductividad (μS cm<sup>-1</sup>)</b>
Arroyo Ñireco	1	SEP-DIC 07	permanente	1.000	0,88	8,1-25,5	6,6	7,7-9,8	28-48	58-61
	2	SEP-DIC 07	efímero	240	1,4	8,3-30	7-8	8,9-9,1	34-35	73,1-75,9
	3	SEP-DIC 07	efímero	< 20	0,3	16,5-30	7,74-8,38	8,6-8,9	39-41	82,8-86,7
Laguna Fantasma		SEP-DIC 06	temporario	10.000	2	11-24	7-7,6	6,4-7	70,2-113,2	98-114
Pinar de Festa		SEP-DIC 06	efímero	13	0,4	11-28	6,5-7,5	-----	75-115	52,6-201
Laguna Teleférico		SEP-DIC 06	temporario	80	1,7	8,4-23,6	7-7,29	7,29-13,8	96-114	201-239
Arroyo Gutiérrez		SEP-DIC 06	permanente	-----	1	13,3-16,9	7,89-8,96	8,8	27-57,4	57,7

---

**Vegetación de los humedales**

Se registraron 34 especies de plantas vasculares dentro de los humedales muestreados (Tabla II). Los humedales de la localidad del Arroyo Bernal tienen poca vegetación acuática o bien carecen de vegetación (Tabla I). Predominan las gramíneas emergentes que pueden tapizar completamente el fondo. Los humedales del Río Ñirihuau son más vegetados y albergan una gran variedad de especies de plantas vasculares hidrófitas y heleófitas tanto emergentes como sumergidas (Tabla II). La vegetación puede ser muy densa o bien distribuirse en parches. Los humedales del Arroyo Ñireco en general carecen de vegetación acuática, a excepción del humedal 1 que posee varias especies de plantas vasculares emergentes y sumergidas que tapizan completamente el fondo (Tabla II). Todos los humedales estudiados del Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche, presentaron especies de plantas vasculares, con predominio de formas emergentes, que en su mayoría tapizan el fondo generando alta complejidad estructural.

Tabla II. Distribución de plantas vasculares (hidrófitas y heleófitas) en los diferentes humedales estudiados. No se incluyen en la lista especies raras o poco abundantes. Humedales del Ejido Municipal: 1 Laguna Fantasma, 2 Pinar de Festa, 3 Teleférico, 4 Arroyo Gutiérrez.

		Humedales																	
		Arroyo Bernal						Río Ñirihuau				Arroyo Ñireco				Ejido Municipal			
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Plantas vasculares																			
<b>Heleófitas</b>																			
Fam. Juncaceae																			
	<i>Juncus balticus</i>															•			
	<i>Juncus bufonius</i>							•	•	•	•								
	<i>Juncus microcephalus</i>							•											
	<i>Juncus pallescens</i>							•	•			•							
	<i>Juncus arcticus</i>											•							
	<i>Juncus stipulatus</i>											•							
	<i>Juncus burkartii</i>											•							•
	<i>Juncus procerus</i>	•		•												•			•
Fam. Cyperaceae																			
	<i>Eleocharis macrostachya</i>											•				•			
	<i>Eleocharis melanostechys</i>											•							•
	<i>Eleocharis sp.</i>															•			
	<i>Carex aematorrhyncha var carralensis</i>											•				•			•
	<i>Carex macloviana</i>															•			
	<i>Carex niederleiniana</i>											•							•
	<i>Schoenoplectus californicus</i>							•											

---

Fam. Poaceae									
	<i>Holcus lanatus</i>						•		•
	<i>Puccinellia glaucescens</i>						•	•	
	<i>Stipa sp.</i>	•	•	•	•	•			
	<i>Poa sp.</i>	•	•	•	•	•			
	<i>Epilobium australe</i>						•	•	
	<i>Polypogon australis</i>	•		•			•		•
Fam. Asteraceae									
	<i>Baccharis patagonica</i>						•		•
Fam. Rosaceae									
	<i>Potentilla anserina</i>		•	•	•	•	•	•	•
Fam. Gunneraceae									
	<i>Gunnera magellanica</i>						•		
<b>Hidrófitas</b>									
Fam. Scrophulariaceae									
	<i>Fonkia uliginosa</i>						•		
	<i>Veronica anagallis-aquatica</i>						•	•	•
Fam. Ranunculaceae									
	<i>Ranunculus trullifolius</i>						•	•	
	<i>Ranunculus spegazzinii</i>						•		
Fam. Halogaraceae									
	<i>Myriophyllum quitense</i>						•	•	•
Fam. Araliaceae									
	<i>Hydrocotyle sp.</i>						•	•	
Fam. Callitrichaceae									
	<i>Callitriche lechleri</i>						•	•	
Fam. Potamogetonaceae									
	<i>Potamogeton linguatus</i>								•
	<i>Cordamine cordata</i>						•		

---

### Historia natural de las especies de anuros estudiadas

En los humedales estudiados se reproducen tres especies de anuros: *Pleurodema thaul* (Leiuperidae), *Pleurodema bufoninum* (Leiuperidae) y *Rhinella spinulosa* (Bufonidae) (Fig. 10). Las tres especies son abundantes en el área de estudio; tienen un patrón reproductivo estacional y desarrollos embrionarios y larvarios relativamente cortos (Úbeda, 1998; Weigandt *et al.*, 2004; Sympson *et al.*, 2006). La actividad reproductiva comienza en la primavera (entre la tercera semana de Septiembre y la primera de Octubre) y puede extenderse hasta fines de Diciembre (Úbeda, 1998; Sympson *et al.*, 2006). Pueden existir en las tres especies uno o varios eventos reproductivos en relación con las precipitaciones de primavera y el hidroperíodo de los humedales (Jara, *obs. per.*). Los huevos son colocados en cordones gelatinosos hialinos adheridos a la vegetación acuática (*P. thaul*) o sueltos sobre el fondo en las partes someras de los humedales (*P. bufoninum* y *R. spinulosa*) (Úbeda, 1998; Weigandt *et al.*, 2004; Sympson *et al.*, 2006) (Fig. 11).

Figura 10. Distribución geográfica de las especies de anuros bajo estudio (los mapas fueron tomados de [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).

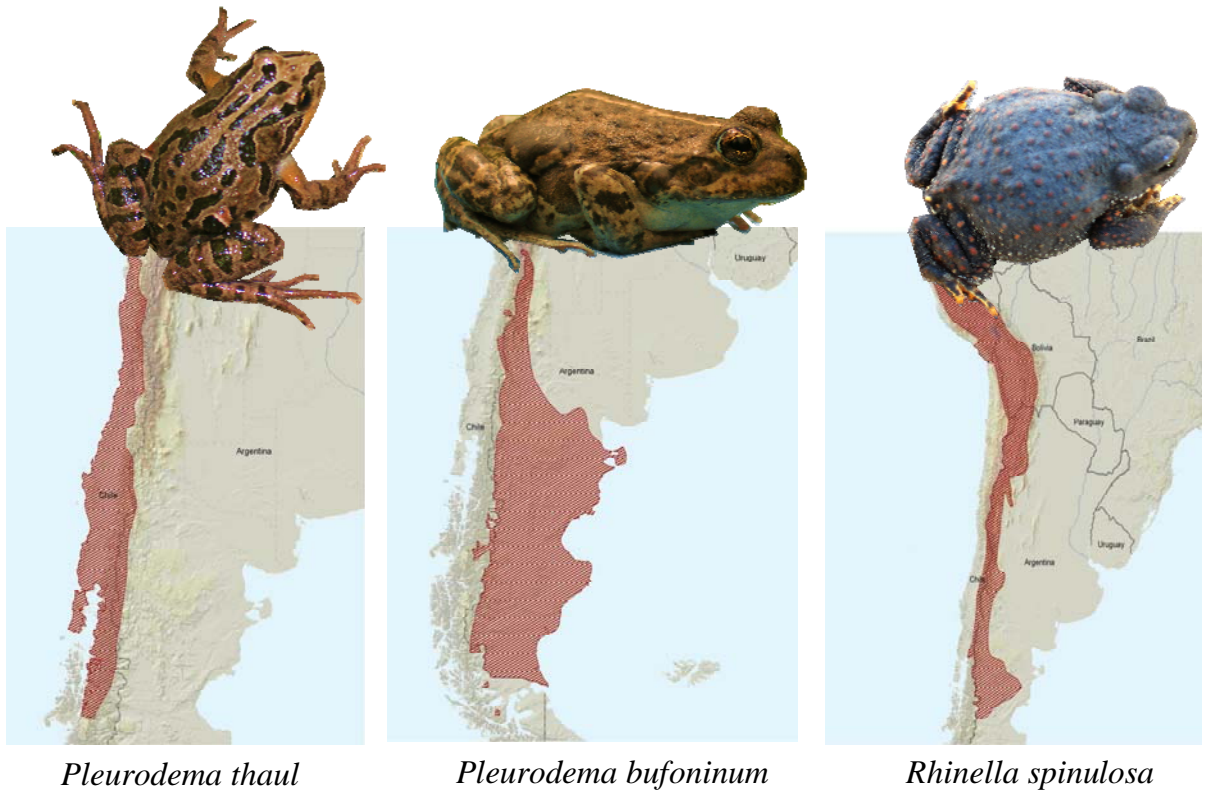
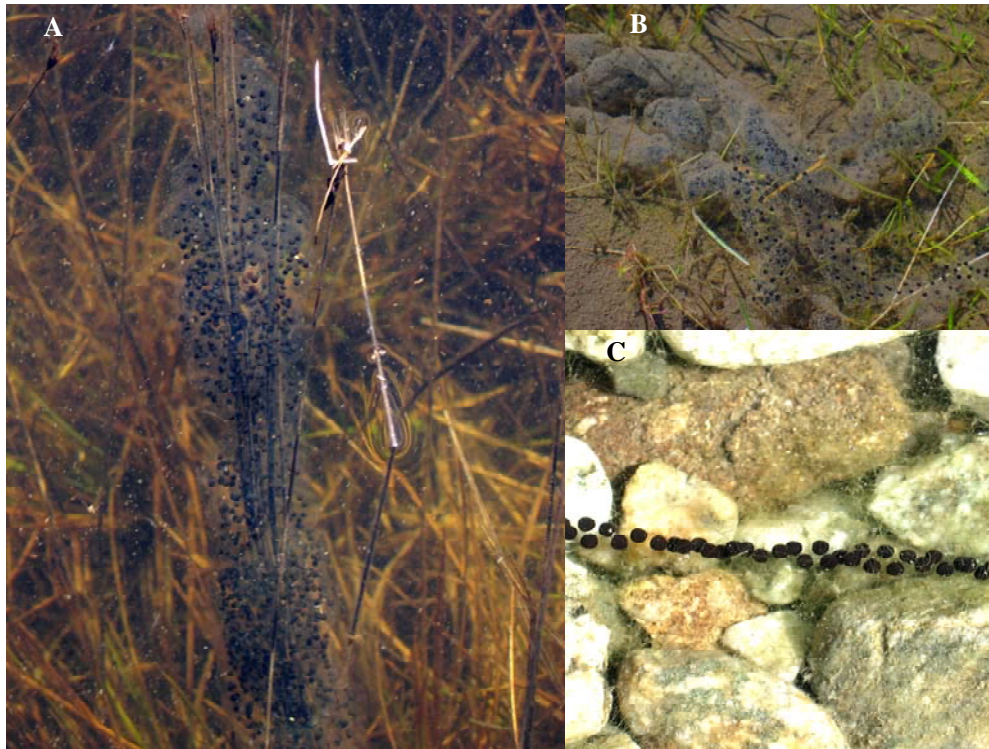




Figura 11. Oviposturas de las especies de anuros bajo estudio: A) *Pleurodema thaul*, B) *P. bufoninum* y C) *Rhinella spinulosa*.



La morfología de los renacuajos de las tres especies de anuros se condice con el grupo de larvas generalizadas de lagunas, correspondiente a la clasificación propuesta por Orton (1953). Estas larvas o renacuajos se caracterizan por presentar un cuerpo relativamente ovoide, una cola de aproximadamente el doble de longitud que el cuerpo, con aletas dorsal y ventral de altura similar a la de la musculatura caudal, y una boca de posición anteroventral. Son renacuajos de alimentación exotrófica, de ambientes lénticos y de hábitos bentónicos, aunque *P. thaul* suele nadar en la columna de agua. Los renacuajos de *P. thaul* (Fig. 12.A) alcanzan hasta 6 cm de longitud total y son de color pardo oliváceo con iridióforos que forman manchas doradas iridiscentes distribuidas en la parte ventral (Jara & Perotti, 2009). La cola presenta musculatura clara, con aletas de altura variable y manchas doradas (Fig. 12.A). Los renacuajos de *Pleurodema bufoninum* (Fig. 12.B) alcanzan hasta 6 cm de longitud total. El cuerpo tiene una coloración críptica, pardo oscura con guanóforos que forman parches dorados. La parte ventral tiene un fondo pardo oscuro con parches plateados o dorados (Weigandt *et al.*, 2004). La cola presenta musculatura oscura con aletas de altura variable y transparentes con algunos melanóforos (Weigandt *et al.*, 2004). Los renacuajos de *Rhinella spinulosa* (Fig. 12.C) alcanzan hasta los 4 cm de longitud total. El cuerpo y la cola son de color pardo oscuro, casi negro (por la presencia de abundantes melanóforos) y con aletas un poco más claras (Jara *et al.*, 2006; Sympson *et al.*, 2006; Chaparro, 2009).

Los renacuajos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* son solitarios, no observándose patrones de agregación en condiciones naturales (Jara, 2002; Jara *et al.*, 2007). Los renacuajos de *Rhinella spinulosa* presentan patrones de agregación en condiciones naturales (Fig. 13). Las agregaciones altamente conspicuas, se forman durante el mediodía y las primeras horas de la tarde en los sectores más someros de los humedales, donde la temperatura parece ser un factor importante en la ocurrencia de las mismas (Jara, 2002; Jara *et al.*, 2006, 2007).

Figura 12. Renacuajos de las especies de anuros bajo estudio, A) *Pleurodema thaul*, B) *Pleurodema bufoninum* y C) *Rhinella spinulosa*.

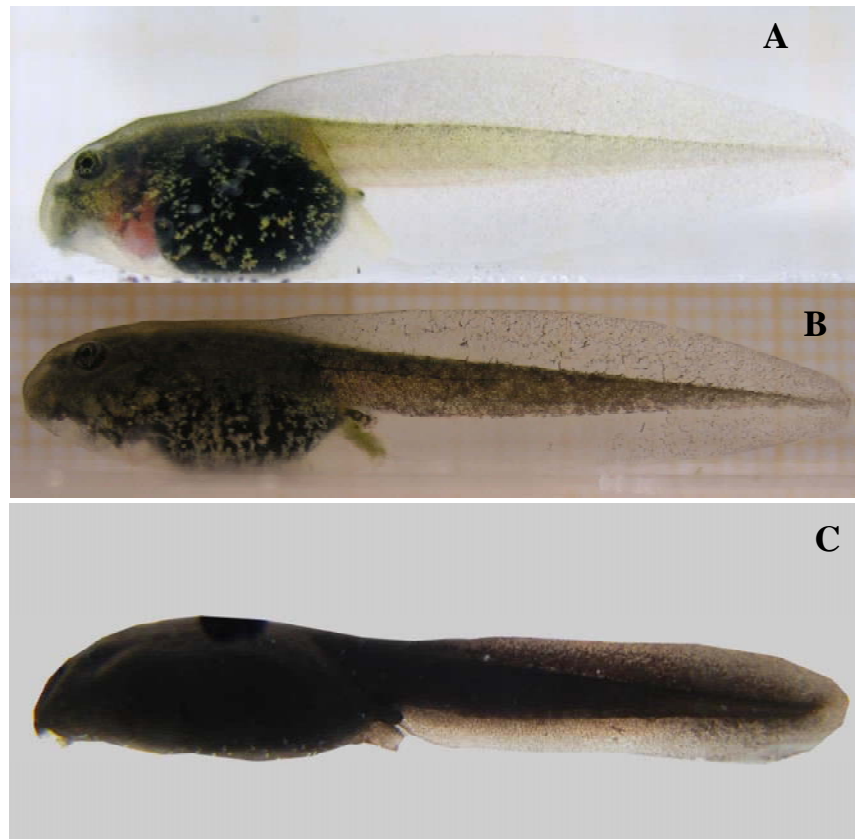


Figura 13. Agregación de renacuajos de *Rhinella spinulosa* en condiciones naturales.



## CAPÍTULO II

RESPUESTAS DEL CRECIMIENTO, DEL DESARROLLO Y DE LA METAMORFOSIS DE  
RENACUAJOS DE *PLEURODEMA* Y *RHINELLA* FRENTE AL HIDROPERÍODO

## INTRODUCCIÓN

El hidroperíodo es el tiempo en el cual un humedal permanece con agua (van der Valk, 2006). Esta variable ambiental determina en gran medida la biota que puede establecerse en cada ambiente (Wilbur, 1987; Shneider & Frost, 1996; Wellborn *et al.*, 1996). Los cuerpos de agua pueden clasificarse entonces dentro de un gradiente de duración del ambiente acuático en el que sus extremos son los ambientes efímeros y los ambientes permanentes (Wellborn *et al.*, 1996). Los organismos acuáticos que habitan ambientes temporarios están restringidos en sus actividades vitales por el tiempo de duración de los cuerpos de agua (Wilbur, 1980; Newman, 1992; Wellborn *et al.*, 1996). Todos estos organismos han desarrollado diversas adaptaciones para poder sobrevivir en estos ambientes (Wilbur, 1980, 1987; Williams, 1987; Skelly, 1997). Algunos organismos del zooplancton desarrollan una diapausa o detención en el desarrollo cuando el ambiente se seca (Frisch, 2002; Frisch & Santer, 2004); otros deben alcanzar un estadio de desarrollo o fase crítica que les permita abandonar el humedal antes de que seque (Wilbur, 1987; Williams, 1987). Ejemplos de estos últimos organismos incluyen invertebrados, como insectos acuáticos (hemípteros, coleópteros y odonatos) y, como únicos vertebrados, los anfibios. Todos ellos metamorfosean para continuar hacia un estadio adulto que puede desplazarse hacia otros ambientes que aún poseen agua (hemípteros y coleópteros acuáticos) o bien vivir en un ambiente terrestre (odonatos y anfibios). La duración del ambiente acuático puede ser variable a lo largo de los años, dependiendo del régimen de lluvias y de la temperatura. Es por eso que estos organismos deben acoplar sus ciclos de desarrollo con la duración del hidroperíodo, por lo cual la duración del ciclo de vida puede ser bastante variable dependiendo

de las condiciones ambientales. Este hecho ha sido observado para un gran número de especies de anfibios del hemisferio norte (e.g. Loman, 1999, 2002; Loman & Claesson, 2003; Morey & Reznick, 2004). En particular, se ha observado que larvas de anfibios o renacuajos que habitan ambientes temporarios responden fisiológicamente a la duración del hidroperiodo (e.g. Crump, 1989; Newman, 1988 a y b, 1989; Tejedo & Reques, 1994; Morey & Reznick, 2001, 2004). Tanto en la naturaleza como en condiciones experimentales, se ha reportado que los renacuajos aceleran el desarrollo cuando están expuestos a desecación o a hidroperiodo corto, a expensas de una reducción en el tamaño del juvenil recién metamorfoseado (e.g. Newman, 1989; Ryan & Winne, 2001; Lane & Mahoney, 2002). Si bien metamorfosear antes de que la laguna se seque es claramente necesario para la supervivencia, la aceleración del desarrollo puede ser regulada por muchas señales, tales como decrecimiento en el volumen de agua, incremento de la densidad poblacional, incremento de la temperatura o cambios en la concentración de solutos (Wilbur, 1977 a y b; Semlitsch & Caldwell, 1982; Newman, 1992, 1994; Denver, 1997 a y b; Denver *et al.*, 1998 a y b).

A partir de estas respuestas plásticas se plantea un “trade-off” o compromiso entre el tiempo que insume alcanzar la metamorfosis antes que las charcas se sequen y el menor tamaño alcanzado. Ambos rasgos de la historia de vida, edad y tamaño a la metamorfosis, están ligados al “fitness” o eficacia biológica del individuo a través de variables como la probabilidad de sobrevivir a la madurez sexual, la edad a la madurez sexual y la fecundidad (Berven, 1990; Morey & Reznick, 2001).

En el noroeste de la Patagonia, *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* presentan periodos de desarrollo cortos (2-3 meses) y se reproducen principalmente en ambientes temporarios como charcas de desborde de la llanura aluvial de ríos y arroyos, mallines y lagunas (Jara, 2002; Jara & Perotti, 2004; Weigandt *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006; Jara *et al.*, 2007). Todos estos ambientes difieren en gran medida en su duración. Por todo lo dicho anteriormente, en este estudio se planteó la siguiente hipótesis: las tres especies de anuros son capaces de

responder plásticamente al hidroperíodo ajustando su crecimiento y desarrollo. Para testear esta hipótesis se realizaron estudios tanto en los ambientes naturales como así también bajo condiciones experimentales.

Para probar esta hipótesis en el campo se colectaron datos del desarrollo, del crecimiento y de la metamorfosis en humedales con diferente hidroperíodo para cada especie de anuro. La predicción fue que renacuajos que habitan humedales con hidroperíodos más cortos poseen desarrollos larvarios más cortos, crecen menos y por lo tanto los metamorfos alcanzan menor peso.

Para probar la hipótesis en condiciones experimentales, se diseñó un experimento en donde se criaron renacuajos en contenedores donde se manipuló el volumen de agua. La predicción fue que las tres especies responden ante una reducción en el volumen de agua acelerando el desarrollo y metamorfoseando a un tamaño menor que en un volumen estable.

## METODOLOGÍA

### **Trabajo de campo**

Entre los meses de septiembre y enero de 2005-2008 se muestrearon poblaciones naturales de las especies de anuros en los humedales señalados y descritos en el área de estudio. Los muestreos se realizaron semanalmente en cada humedal (Tabla I). Se tomaron dos tipos de variables 1) bióticas asociadas al desarrollo de los renacuajos y 2) variables del ambiente.

1) Variables bióticas: las variables bióticas consideradas fueron estadios del desarrollo y peso de los renacuajos. Dichas variables fueron obtenidas en cada visita (muestreo) realizada a los ambientes y para cada especie de anuro. Los muestreos abarcaron 10 humedales ubicados en dos localidades (Arroyo Bernal y Río Ñirihuau) para *Pleurodema bufoninum*, tres humedales ubicados dentro del ejido municipal de San Carlos de Bariloche para *Pleurodema thaul* (Laguna Fantasma, humedal Pinar de Festa y laguna Teleférico) y tres humedales localizados en la

localidad del Arroyo Ñireco para *Rhinella spinulosa*. Las capturas de renacuajos de cada especie se realizaron con una red de copo de boca rectangular (25 x 36 cm) y de 25 cm de longitud (1 mm de poro de malla). Siempre se aplicó el mismo esfuerzo de captura realizando tres redadas de 2 metros de longitud cada una, en tres sitios de cada humedal. Los sitios fueron seleccionados teniendo en cuenta la fisonomía de los humedales. En humedales de poca profundidad (de 5 a 30 cm) y sin vegetación las redadas se pasaron en el centro del humedal y en dos de sus márgenes. En humedales más profundos (> 30 cm) y de mayor complejidad estructural se seleccionaron tres sitios de la costa que representaran diferentes formas de vegetación acuática. Los renacuajos colectados en cada ocasión de muestreo fueron colocados en una bandeja de donde se extrajo una submuestra con una red de mano. La submuestra fue fijada en formol 10 % y trasladada al laboratorio. En el laboratorio los renacuajos fueron pesados en grupo cuando resultaron menores a un peso de 0,01 g (estadios 24-27) o individualmente (a partir del estadios 28) utilizando una balanza electrónica (OHAUS Scout Pro, res. 0,01 g) y además se determinó el estadio de desarrollo (Gosner, 1960, Apéndice 1) bajo microscopio binocular. Como cada submuestra contenía individuos de varios estadios de desarrollo se utilizaron estos datos para construir gráficos de estadios del desarrollo vs. peso y describir de esta forma el patrón de distribución de estadios y pesos en humedales con diferente hidropériodo (Morey & Reznick, 2004). La tasa de crecimiento de los renacuajos se obtuvo dividiendo el peso de los primeros renacuajos que alcanzaron estadio 40-41 sobre el tiempo en días transcurrido desde las primeras eclosiones y hasta alcanzar dicho estadio del desarrollo (Morey & Reznick, 2004 con modificaciones). En cada humedal se registró el peso y el tiempo a la metamorfosis de las primeras cohortes de renacuajos, tomando como tiempo inicial al momento de la eclosión de las primeras oviposturas.

2) Variables del ambiente: se calculó la duración en días del hidropériodo de cada humedal a partir de las primeras oviposturas encontradas y hasta que el humedal se secó completamente.



## Trabajo experimental

En este experimento se probó si la reducción en el volumen de agua influencia el desarrollo y el crecimiento de los renacuajos de las tres especies de anuros, *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*. Los experimentos con *Pleurodema bufoninum* y *P. thaul* fueron realizados en la primavera de 2006 y los experimentos con *Rhinella spinulosa* en la primavera de 2007.

### Preparación y monitoreo de los experimentos

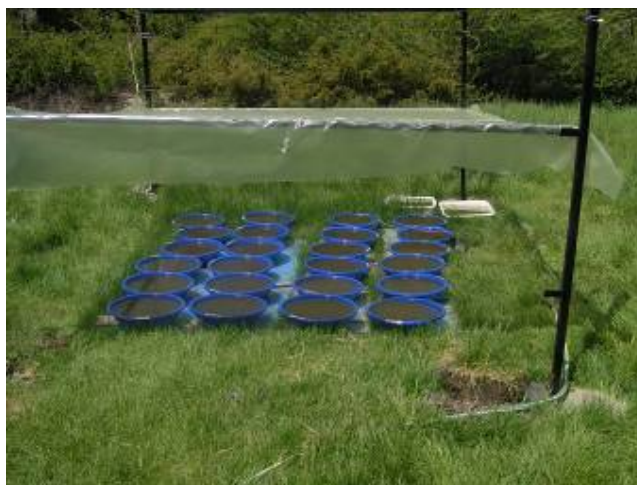
Se colectaron 4 oviposturas de cada especie, para *Pleurodema thaul* las oviposturas fueron colectadas en la Laguna Fantasma, mientras que las oviposturas de *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* fueron colectadas en el humedal 1 de la Localidad Ñireco. Todas las oviposturas se mantuvieron bajo condiciones de fotoperíodo y temperatura controlados hasta la eclosión (12:12 L-O;  $18 \pm 1$  °C). La luz del cuarto fue proporcionada por 4 lámparas fluorescentes Philips daylight TLT 40W/54RS. Después de la eclosión las larvas provenientes de diferentes oviposturas fueron mezcladas y mantenidas en un predio externo al laboratorio de Fotobiología (INIBIOMA-CRUB, CONICET) en contenedores con agua de arroyo y alimentados con un cultivo de algas y alimento para peces hasta alcanzar el estadio de desarrollo deseado para iniciar los experimentos (estadios 25-26 de Gosner, 1960).

Para los renacuajos de *Pleurodema* se empleó un diseño en bloques con un arreglo factorial de los tratamientos, especie (*P. thaul* y *P. bufoninum*) y volumen de agua (estable y variable). Cada combinación de tratamientos fue replicada un total de seis veces (seis bloques). Para los renacuajos de *Rhinella spinulosa* se empleó un diseño completamente aleatorizado con diez replicas por nivel de tratamiento (volumen de agua).

Las unidades experimentales fueron contenedores circulares de plástico de 38 cm de diámetro y 12 cm de profundidad. Cada contenedor fue llenado con 9 l de agua de arroyo e inoculados con 250 ml de sedimento y con 200 ml de un cultivo mixto de algas (*Clamidomonas*

sp. + *Scenedesmus* sp.). Después de una semana, en cada contenedor se introdujeron cinco renacuajos en estadio 25-26. Los contenedores fueron dispuestos al aire libre protegidos bajo un nylon para evitar que la lluvia alterara el volumen de agua (Fig. 1). Se colocó una malla de tipo “media sombra” para proteger los contenedores del calor excesivo. Los renacuajos fueron provistos cada tres días de 10 ml de una mezcla de agua con 0,5 g de alimento para peces de agua dulce previamente macerado (<sup>®</sup>VitaFish). Durante la primera semana de cría de los renacuajos el nivel de agua de los contenedores fue mantenido constante. A partir de la segunda semana se permitió que el agua del tratamiento de volumen variable se evaporara naturalmente. En este tratamiento se dejaron evaporar 6 litros de agua en cada contenedor (proceso que duró entre 14 y 16 días) y el volumen remanente (3 l) se mantuvo constante hasta que todos los renacuajos completaran la metamorfosis.

Figura 1. (Arriba) Disposición de los contenedores para el experimento de hidroperíodo. Registro de temperatura (abajo).



Diariamente y cada una hora se registraron datos de temperatura mediante el empleo de data loggers (HOBO) o sondas multiparamétricas (HANNA HI 98150) cuyas terminales se dispusieron a 5 cm del fondo de los contenedores para evaluar posibles efectos de la temperatura sobre los resultados del experimento. Para evaluar diferencias en el crecimiento y desarrollo larval, todos los renacuajos del experimento fueron pesados y se determinó su estadio de desarrollo cuando surgió el primer renacuajo con cuatro miembros (estadio 42) en alguno de los contenedores (día 32). Todos los renacuajos fueron pesados en una balanza digital y el estadio de desarrollo fue registrado por observación bajo microscopio binocular (OLYMPUS SZ.30). Después de tomar los datos, cada renacuajo fue devuelto a su respectivo contenedor. El

experimento se continuó hasta que todos los individuos metamorfosearon. Los individuos con cuatro miembros fueron trasladados al laboratorio y alojados en una cuarto con fotoperíodo y temperatura controlados (12:12 L-O;  $18 \pm 1$  °C), y los individuos fueron mantenidos individualmente en recipientes con 1 cm de agua hasta que reabsorbieran completamente la cola (estadio 46), momento en el cual fueron pesados mediante balanza digital.

### **Análisis estadísticos**

**Datos de Campo.** Para evaluar si existen diferencias a nivel poblacional en el tiempo a la metamorfosis y el peso del metamorfo se emplearon ANOVAs de una vía para cada especie de anuro. Previamente se probaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias. En caso de no cumplirse estos supuestos aun aplicando las transformaciones correspondientes (log, arcsen raíz, raíz) se utilizaron los test no paramétricos Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y el método de comparaciones múltiples de Dunn. Para establecer relaciones entre período larvario, peso del metamorfo y duración de los humedales se realizaron regresiones entre las variables para cada especie.

**Datos de laboratorio.** Las variables respuesta analizadas correspondieron a: supervivencia (porcentaje de individuos supervivientes), tiempo a la metamorfosis (días transcurridos desde el inicio del experimento hasta que el primer alcanzar el estadio 46) y peso del metamorfo. Para las especies de *Pleurodema* los datos fueron analizados por medio de ANOVAs de tres factores (bloque, especie de anuro y volumen de agua) para cada variable respuesta. Para *Rhinella spinulosa* se realizó un ANOVA de un factor (volumen de agua) para cada variable respuesta (peso larval, estadio larval, tiempo a la metamorfosis y peso del metamorfo).

**Comparación de las respuestas plásticas entre las especies.** Para comparar las respuestas de las especies respondieron a los tratamientos de hidroperíodo se calculó un índice de plasticidad desarrollado por Richter-Boix *et al.* (2006), que brinda una medida sin unidad de la plasticidad de un rasgo. El índice determina el cambio en una característica (tiempo y peso a la metamorfosis) a través de los tratamientos, que en este caso es el volumen de agua (volumen estable (VE) y volumen variable (VV)). Para ello se mide el cambio que ocurre en esa variable entre el tratamiento de hidroperíodo variable dividido por el valor medio de la variable en el tratamiento estable  $[(VV-VE)/VE]$ . Un valor negativo del índice determina un decrecimiento en el valor de la característica, mientras que un valor positivo indica un incremento en el cambio de la variable. Para probar diferencias significativas en el índice de plasticidad para las variables tiempo y peso a la metamorfosis se realizó un ANOVA de un factor para cada variable, cuyo tratamiento fueron las especies de anuros. Para identificar grupos homogéneos se realizó el procedimiento de Bonferroni (SigmaStat 3.5).

## RESULTADOS

### Trabajo de Campo

**Reproducción.** La reproducción de las especies estudiadas comienza en la primavera temprana con pequeñas diferencias de tiempo según el ambiente. En general la extensión de la época reproductiva estuvo asociada a la duración del ambiente (Tabla I). En ambientes de mayor hidroperíodo (Laguna Fantasma, Laguna Teleférico) *Pleurodema thaul* se reprodujo continuamente entre los meses de septiembre y diciembre durante los periodos 2006 y 2007. *Pleurodema bufoninum* se reprodujo continuamente durante los meses de septiembre a diciembre de 2005 y 2006 en ambientes más duraderos de la localidad del Río Ñirihuau (humedal 1) y Arroyo Ñireco (humedal 1) (Tabla I). La excepción fue en el humedal del Arroyo Gutiérrez

---

(humedal permanente) en el cual se observó desde el año 2006 hasta el 2008 que la reproducción de *P. thaul* y *P. bufoninum* ocurre entre la primera y segunda semana de octubre.

La reproducción de *Rhinella spinulosa* fue determinada en una única localidad del área de estudio, Arroyo Ñireco. *Rhinella spinulosa*, mostró un patrón de reproductivo más explosivo que las especies de *Pleurodema*. El periodo reproductivo se concentró entre la última semana de septiembre y las dos primeras semanas de octubre en 2007 y 2008 (Tabla I). En 2008 también se observó un único evento reproductivo en el mes de noviembre en el humedal 1 de la localidad del Arroyo Ñireco.

Tabla I. Duración del periodo reproductivo (oviposturas) de las tres especies de anuros en cada humedal del área de estudio. Para *Pleurodema bufoninum* los datos corresponden a la temporada reproductiva 2006; para *Pleurodema thaul* corresponden a las temporadas reproductiva 2006-2007; para *Rhinella spinulosa* corresponden a 2007 y 2008.

Especie	Localidad	Humedal	Duración del hidropériodo (días)	Oviposturas			
				SEP	OCT	NOV	DIC
<i>P. thaul</i>	Laguna Fantasma		107	x	x	x	x
	Pinar de Festa		71	x	x		
	Laguna Teleférico		148	x	x	x	x
	Río Ñirihuau	1	135	x	x		
		2	135	x	x		
	Arroyo Gutiérrez		365		x		
<i>P. bufoninum</i>	Arroyo Bernal	1	138	x	x		x
		2	110		x		
		3	110		x	x	
		4	110		x		
		5	91		x		
		6	91		x	x	x
	Río Ñirihuau	1	135	x	x		x
		2	135	x			x
		3	135	x	x	x	
		4	125	x	x		x
	Arroyo Ñireco	1	360	x	x	x	x
		3	81	x			
	Arroyo Gutiérrez				x		
<i>R. spinulosa</i>	Arroyo Ñireco	1	360	x	x		
		2	100	x	x		
		3	81	x	x		
		4	89	x	x		

**Desarrollo y crecimiento larvario.** El desarrollo larvario en las dos especies de *Pleurodema* presenta un patrón similar (Fig. 2, 3 y 4). Se observa un rápido aumento de la masa corporal hasta alcanzar el máximo peso larvario en estadio 38-42 en los humedales de mayor duración (Fig. 2: humedales 1-3; Fig. 4: Laguna Fantasma) o bien en estadios más tempranos (35-40) en humedales de menor duración (Fig. 2: humedales 5 y 6; Fig. 3: humedales 2 y 3; Fig. 4: humedal Pinar de Festa). Con el avance del desarrollo y al alcanzar el clímax metamórfico (estadios 42-46) se observa una pérdida progresiva en peso, período en el cual se producen los mayores cambios a nivel morfológico y fisiológico, los individuos dejan de alimentarse hasta transformarse en un juvenil terrestre e insectívoro.

Las tasas de crecimiento larval de *Pleurodema bufoninum* fueron más altas en los humedales 1, 2 y 4 de la localidad del Río Ñirihuau (Tabla II), mientras que los valores de tasas más bajas fueron registradas en el humedal 3 de la localidad del Río Ñirihuau y en el humedal 5 de la localidad del Arroyo Bernal (Tabla II).

La población de *Pleurodema thaul* de la Laguna Fantasma presentó mayores valores de peso en comparación con aquellos observados para la población de humedal Pinar de Festa (Fig. 4). El desarrollo larvario fue más corto en la población Pinar de Festa (Pinar de Festa =  $75 \pm 2$  días, N = 26; Laguna Fantasma =  $91 \pm 2$  días, N = 36, F-ratio = 15,72,  $P < 0,001$ ). La tasa de crecimiento larval fue mayor en las larvas de la Laguna Fantasma, cuadruplicando la tasa de crecimiento larval observada en la población de Pinar de Festa (Tabla II).



Figura 2. Relación entre peso húmedo y estadios del desarrollo de renacuajos de *Pleurodema bufoninum* colectados en 6 humedales de la localidad del Arroyo Bernal (2005). La línea vertical indica el estadio 42 de Gosner (1960), en que aproximadamente comienzan a perder peso corporal.

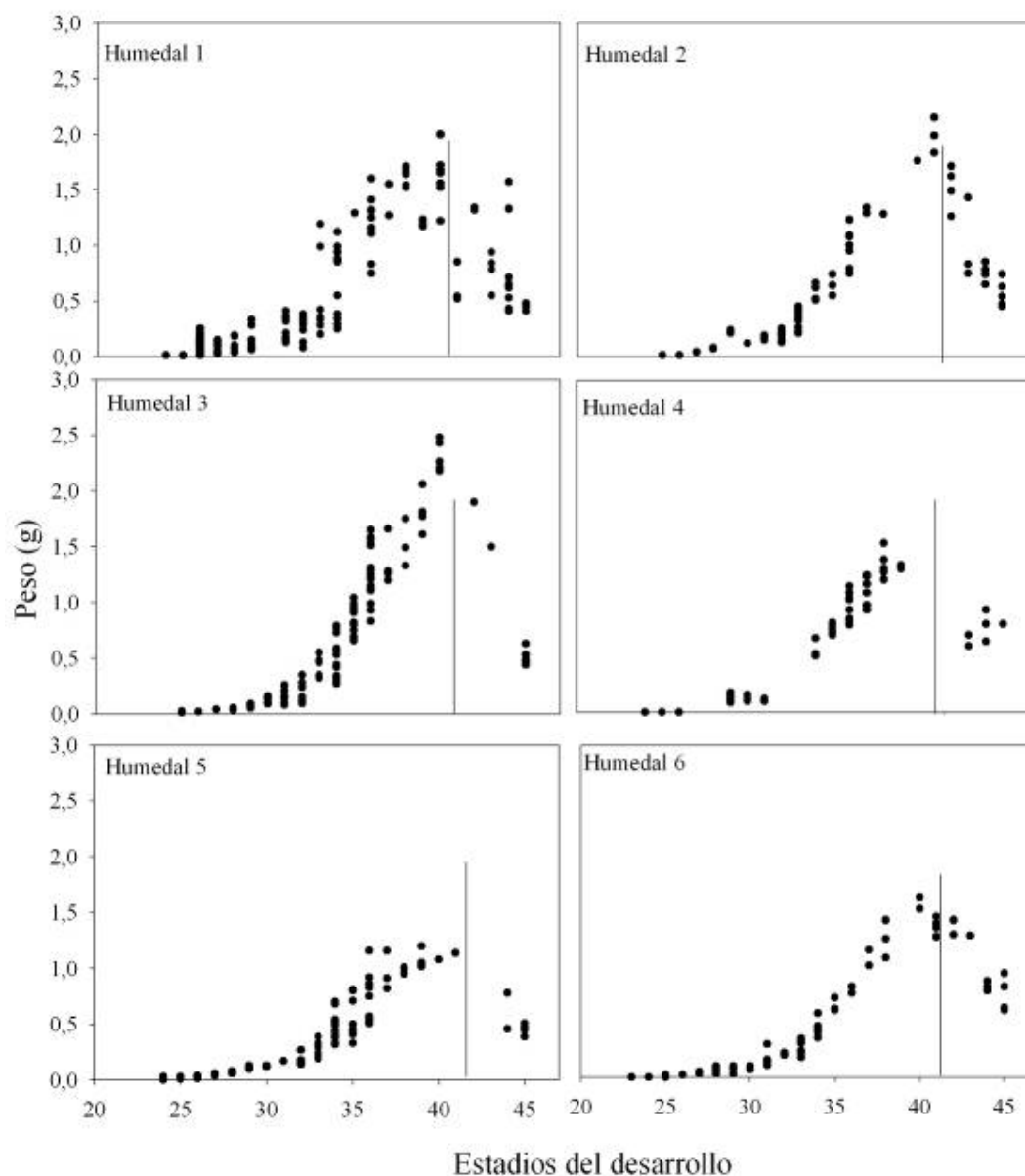


Figura 3. Relación entre peso húmedo y estadios del desarrollo de renacuajos de *Pleurodema bufoninum* colectados en 4 humedales de la localidad del Río Ñirihuau (2005). La línea vertical indica el estadio 42 de Gosner (1960), en que aproximadamente comienzan a perder peso corporal.

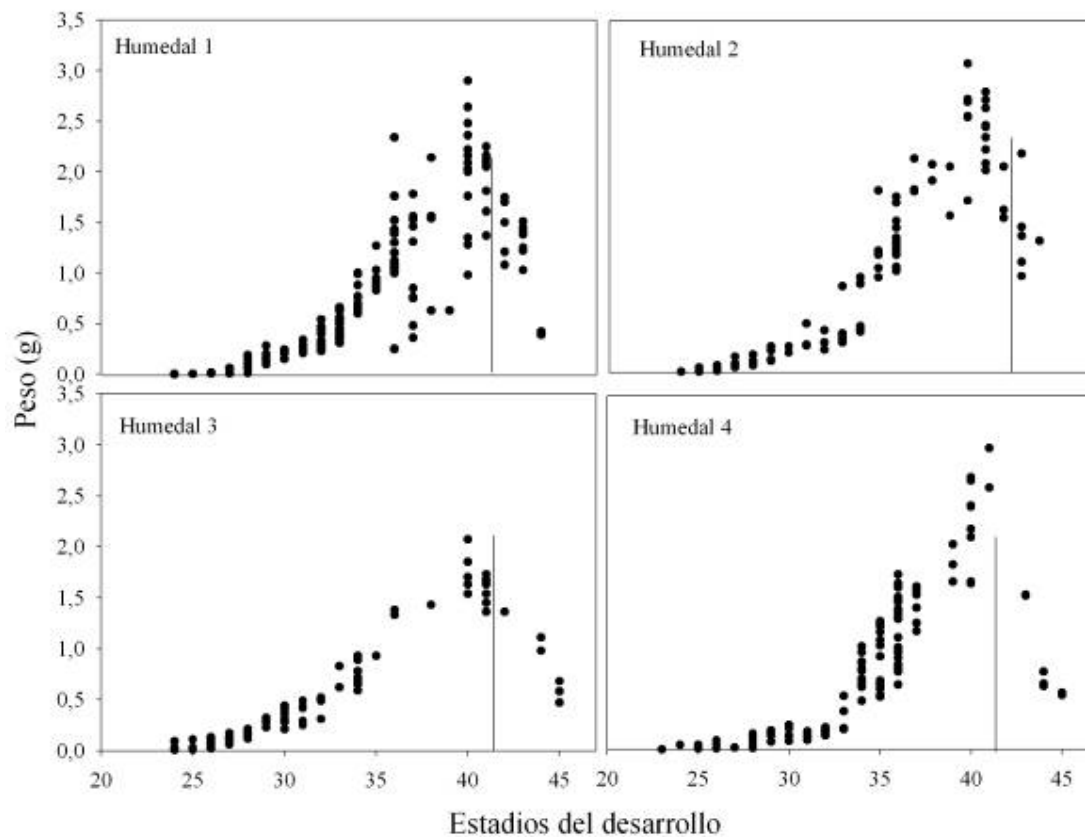


Figura 4. Relación entre peso húmedo y estadios del desarrollo de renacuajos de *Pleurodema thaul* colectados en 2 humedales localizados en el Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche (2006). La línea vertical indica el estadio 42 de Gosner (1960), en que aproximadamente comienzan a perder peso corporal.

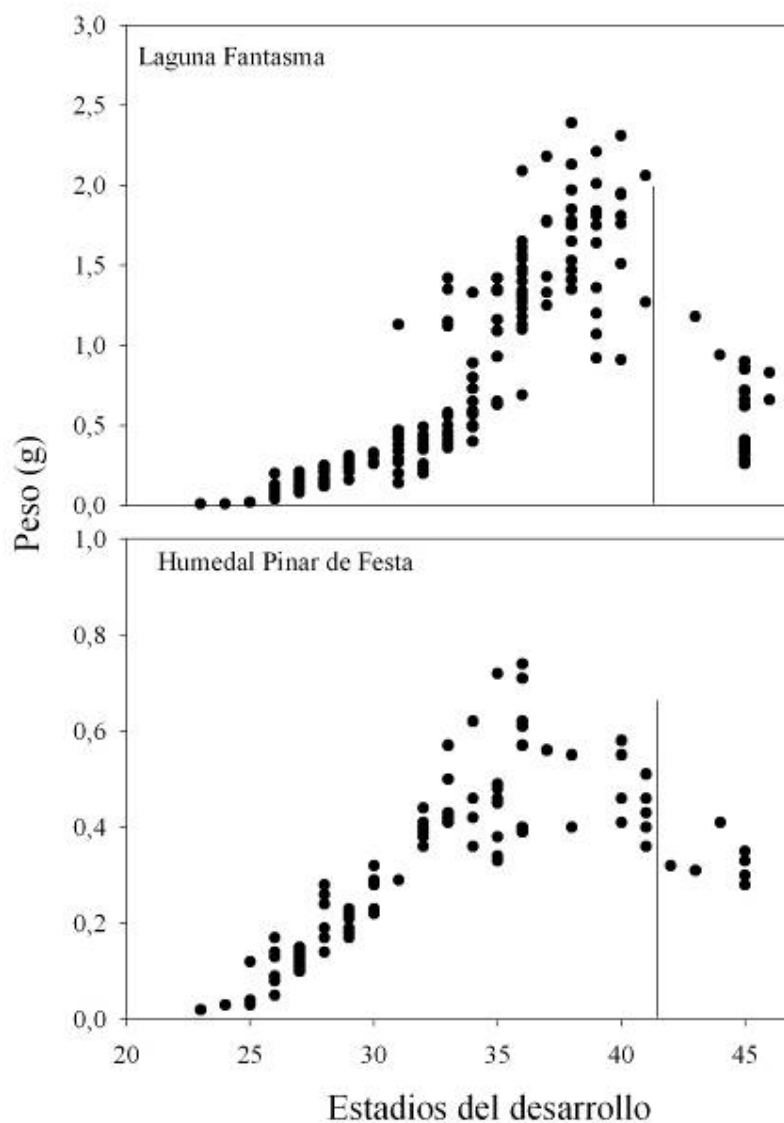


Tabla II. Tasa de crecimiento promedio de renacuajos de las tres especies de anuros en los humedales estudiados. El cálculo de la tasa de crecimiento se realizó sobre los renacuajos de las primeras cohortes presentes en la temporada reproductiva. N = número de individuos.

Especie de anuro	Localidad	Humedal	Duración del hidroperíodo(días)	Tasa de Crecimiento mg/día ( $\pm$ DS)	N
<i>P. bufoninum</i>	Arroyo Bernal	1	138	18,9 (5,9)	7
		2	110	21,28 (3,6)	9
		3	110	25,7 (3)	12
		4	110	17,38 (2,01)	10
		5	91	14,88 (1,1)	9
		6	91	23,45 (1,5)	7
	Río Ñirihuau	1	120	28,9 (6,7)	13
		2	135	29,12 (2,7)	13
		3	135	14,25 (1,8)	14
		4	125	26,83 (4,57)	13
<i>P. thaul</i>	Laguna Fantasma		107	28,01 (4,14)	17
	Pinar de Festa		76	6,18 (1,32)	9
<i>R. spinulosa</i>	Arroyo Ñireco	1	360	4,6 (0,35)	14
		2	100	4,14 (1,1)	38
		3	81	3,1 (0,35)	10

Los renacuajos de *Rhinella spinulosa* en todos sus estadios fueron comparativamente de menor tamaño que los de las especies de *Pleurodema* y su desarrollo larval fue más sincrónico. El aumento de masa corporal siguió el mismo patrón descrito para las especies de *Pleurodema*. Se observó un rápido aumento de la masa corporal hasta alcanzar el máximo peso en los estadios 38-40 (Fig. 5). Luego se observó una pérdida en el peso hasta alcanzar el estadio de juvenil (46). *Rhinella spinulosa* eclosionó en estadios más tempranos (estadio 19) que *Pleurodema* y demoró dos o tres días en alcanzar una natación activa (estadio 26). En la localidad Arroyo Ñireco los individuos alcanzaron un peso significativamente más bajo en los humedales 2 y 3 respecto del humedal 1 (Fig. 5). En este último humedal las larvas superaron ampliamente el peso máximo alcanzado en los otros dos humedales. Se observó que la tasa de crecimiento larval en *R. spinulosa* fue inferior a las tasas de crecimiento observadas en las especies de *Pleurodema* (Tabla II). La mayor tasa de crecimiento de esta especie fue observada en el humedal 1 de la localidad del Arroyo Ñireco (Tabla II). Durante períodos en los que ciertos sectores de los humedales se secaron por completo, se observó una alta mortalidad de renacuajos de *R. spinulosa* (Fig. 6).

Figura 5. Relación entre peso húmedo y estadio del desarrollo de renacuajos de *Rhinella spinulosa* en tres humedales de la localidad del Arroyo Ñireco (2007). La línea vertical indica el estadio 42 de Gosner, en que aproximadamente comienzan a perder peso corporal. Estadios de desarrollo *sensu* Gosner (1960).

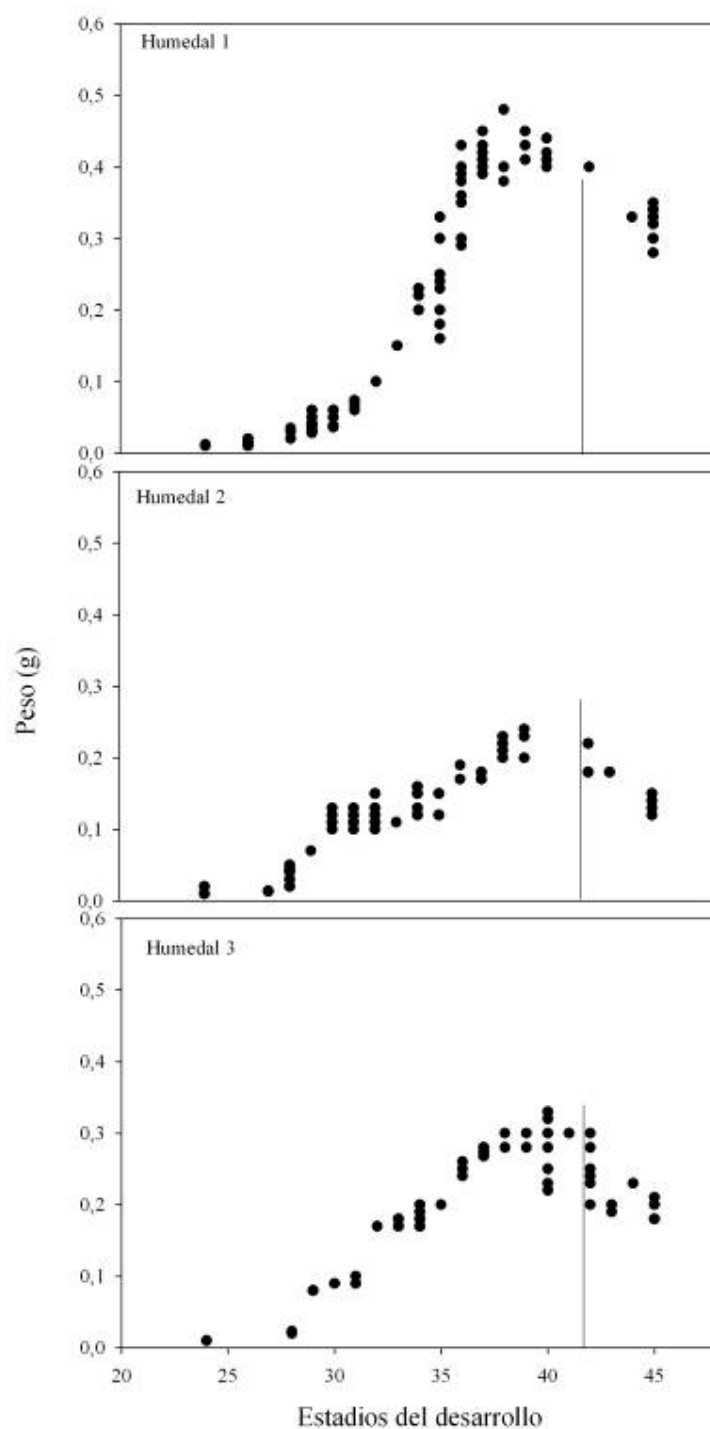


Figura 6. Renacuajos de *Rhinella spinulosa* muertos por desecación en una de las charcas de la localidad del Arroyo Ñireco donde la especie se reproduce.



**Peso de los metamorfos.** En las especies de *Pleurodema* el peso de los metamorfos fue aproximadamente la mitad del peso alcanzado en el estadio 42 (Fig. 2, 3 y 4). Los metamorfos de *Pleurodema bufoninum* de la localidad Río Ñirihuau resultaron ser significativamente más grandes que los provenientes de la localidad Arroyo Bernal (peso promedio  $\pm$  DS, Ñirihuau =  $0,94 \text{ g} \pm 0,37 \text{ g}$ ,  $N = 50$ ; Bernal =  $0,65 \text{ g} \pm 0,22 \text{ g}$ ,  $N = 61$ ; Mann-Whitney  $U = 46,13$ ,  $P = 0,03$ ; Fig. 7). Por otro lado, dentro de la localidad Río Ñirihuau se encontraron diferencias significativas en el peso de los metamorfos entre humedales (ANOVA  $F_{3,46} = 12,26$ ,  $P < 0,001$ ) (Fig. 7). De manera similar en la localidad Arroyo Bernal se observaron diferencias significativas en el peso de los metamorfos entre humedales (Kruskal-Wallis  $H_5 = 2,1$ ,  $P = 0,003$ ,  $N = 61$ ). Las comparaciones *a posteriori* para Arroyo Bernal mostraron diferencias significativas entre el peso de los metamorfos del humedal 5 vs. el resto ( $P < 0,05$  para todas las comparaciones posibles) (Fig. 7).

En el caso de *Pleurodema thaul*, el peso de los metamorfos fue significativamente mayor en la Laguna Fantasma respecto de Pinar de Festa (peso promedio  $\pm$  SD, Laguna Fantasma =  $0,63 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ ,  $N = 36$ , humedal Pinar de Festa =  $0,28 \text{ g} \pm 0,007 \text{ g}$ ,  $N = 26$ ;  $F\text{-ratio} = 38,82$ ,  $P < 0,001$ ). No se observaron diferencias significativas en el peso de los metamorfos entre las fechas de captura en el humedal Pinar de Festa ( $F\text{-ratio} = 1,28$ ,  $P = 0,32$ ,  $N = 26$ ), pero si se observaron diferencias significativas en la Laguna Fantasma ( $F\text{-ratio} = 39,31$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 36$ ) (Fig. 8). En la Laguna Fantasma se observaron diferencias significativas entre el peso de los metamorfos de diciembre y enero, provenientes de diferentes cohortes larvarias ( $F\text{-ratio} = 92,7$ ,  $P < 0,005$  para todas las comparaciones) (Fig. 8).



Figura 7. Peso húmedo de metamorfos de *Pleurodema bufoninum* (media  $\pm$  ES) en los humedales de la localidad del Río Ñirihuau y de la localidad del Arroyo Bernal en el año 2006. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

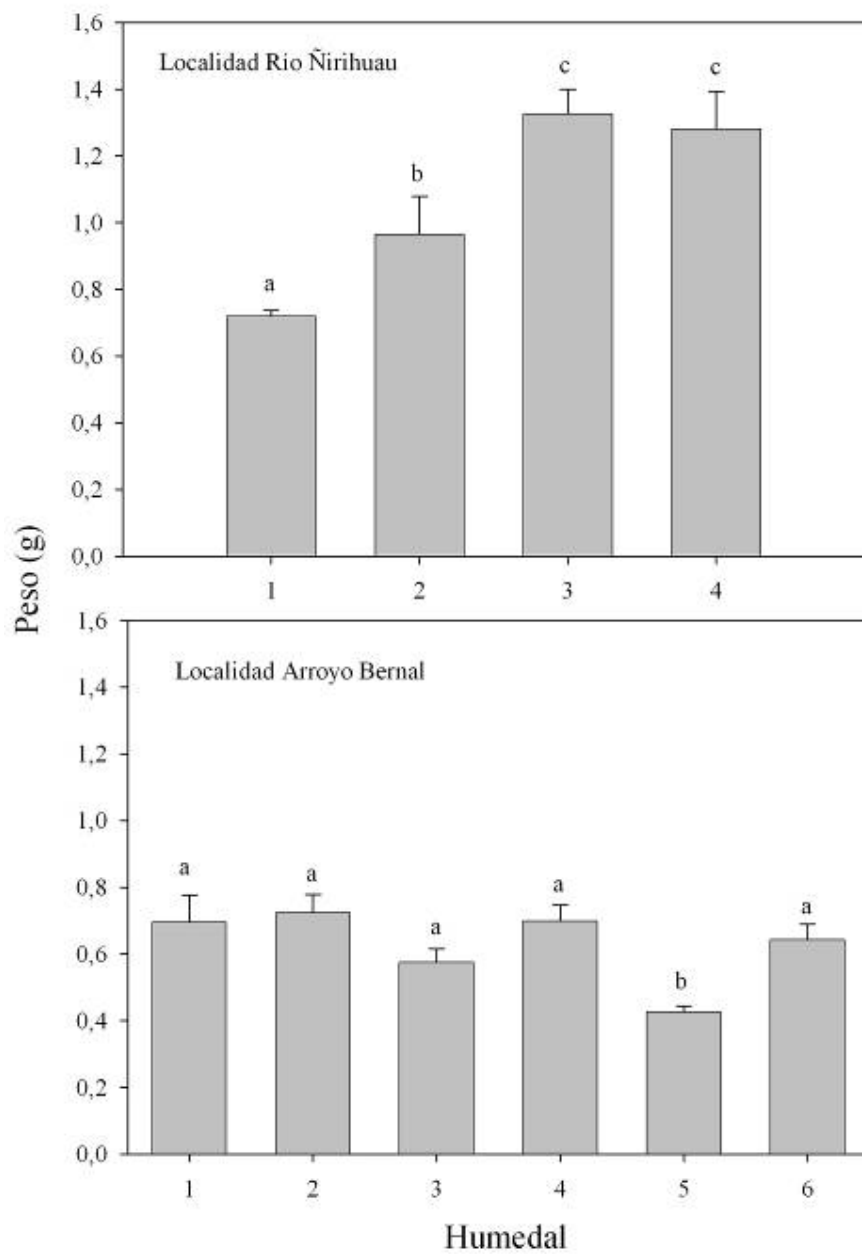
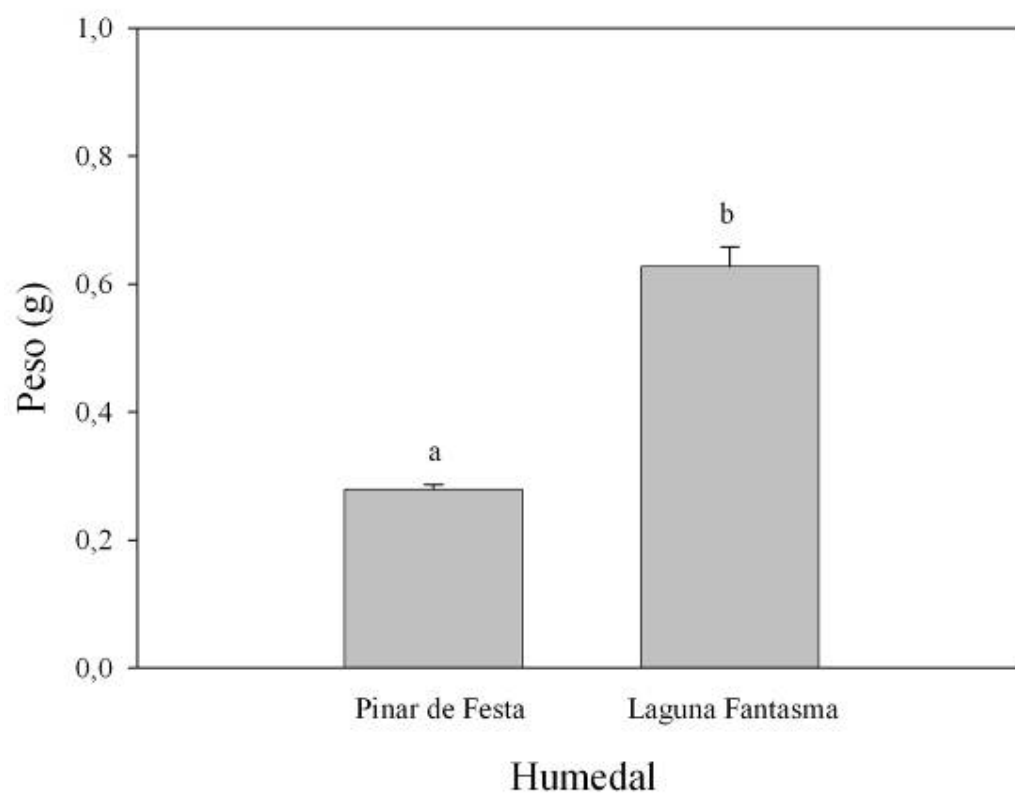
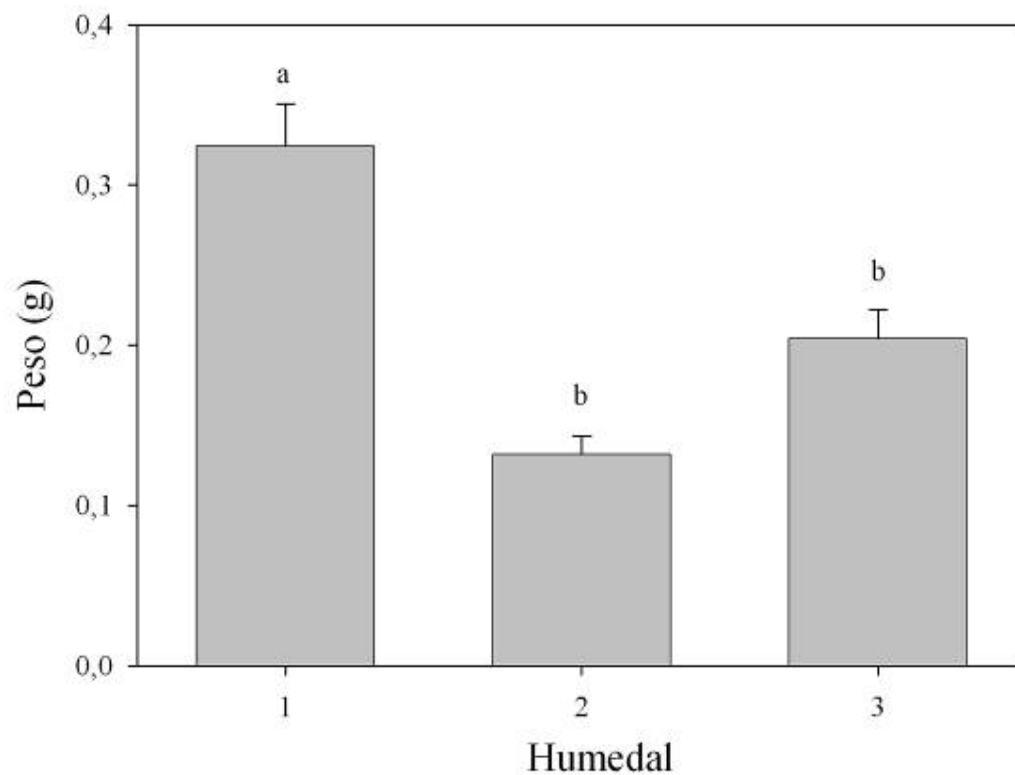


Figura 8. Peso húmedo de metamorfos de *Pleurodema thaul* (media  $\pm$  ES) en dos humedales del Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche en el año 2006. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



Para *Rhinella spinulosa* se observaron diferencias significativas en el peso de los metamorfos entre los humedales de la localidad Arroyo Ñireco (Kruskall-Wallis  $H_2 = 18,37$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 23$ ). El peso promedio de los metamorfos del humedal 1 fue significativamente mayor en comparación con los humedales restantes (test de Dunn  $P < 0,05$  para las comparaciones entre el humedal 1 vs. 2 y 3; Fig. 9).

Figura 9. Peso húmedo de los metamorfos de *Rhinella spinulosa* (media  $\pm$  ES) en tres humedales de la localidad del Arroyo Ñireco en el año 2007. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



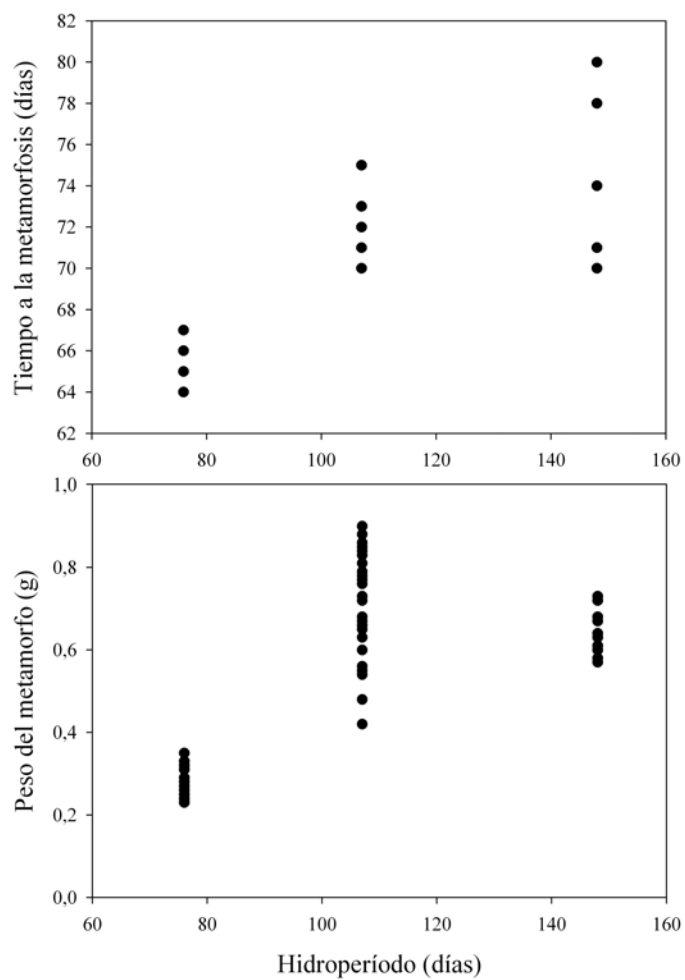
**Relaciones entre periodo larvario, peso de los metamorfos y permanencia del ambiente.** En la especie *Pleurodema thaul* se encontró una correlación positiva significativa entre la duración del hidroperíodo y la longitud del período larvario de la primera cohorte ( $R^2 = 0,605$ ;  $F_{1,33} = 50,48$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 10), observándose una mayor longitud del periodo larvario en humedales de mayor duración. También se encontró una relación significativa positiva entre el peso de los metamorfos y la duración del humedal, siendo mayor el peso de los metamorfos en humedales de mayor duración ( $R^2 = 0,4$ ;  $F_{1,33} = 38,82$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 10).

En la especie *Pleurodema bufoninum* se observó una relación positiva significativa entre la duración del período larvario de la primera cohorte y la duración del hidroperíodo ( $R^2 = 0,537$ ;  $F_{1,105} = 42,57$ ,  $P < 0,001$ ), observándose un período larvario más largo en ambientes de mayor duración. También fue observada una relación positiva significativa entre el peso de los metamorfos y la duración del hidroperíodo ( $R^2 = 0,552$ ,  $F_{1,101} = 44,29$ ,  $P < 0,001$ ), observándose un mayor peso del metamorfo en humedales de mayor duración.

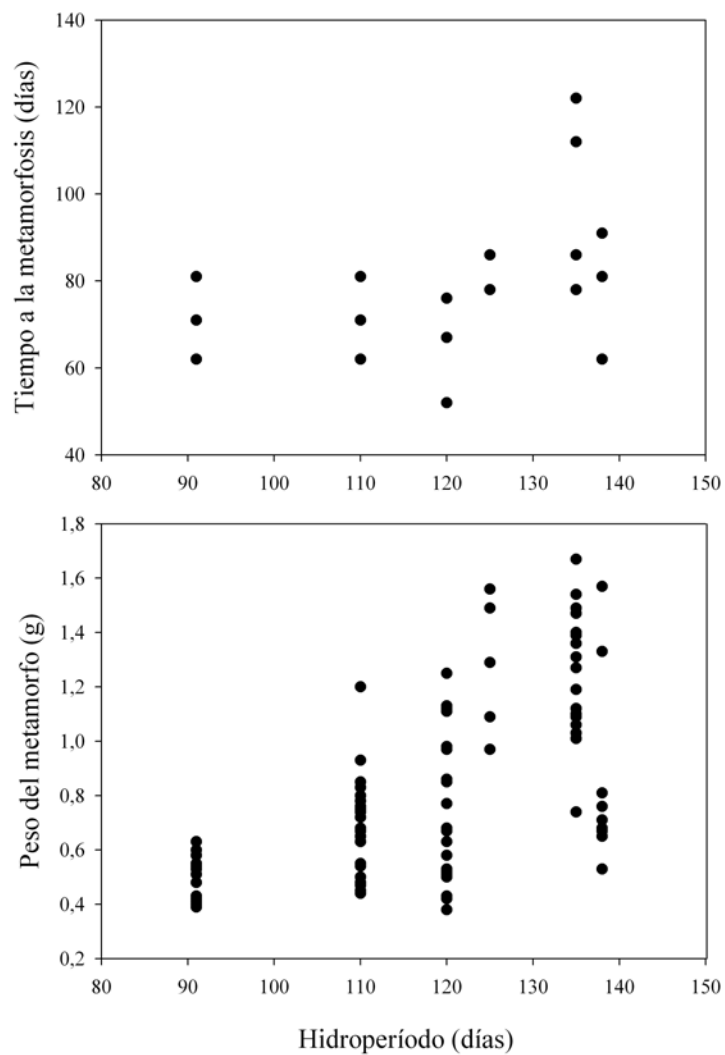
En la especie *Rhinella spinulosa* no se observó una relación entre la duración del hidroperíodo y la duración del período larvario de la primera cohorte de renacuajos ( $R^2 = 0,07$ ;  $F_{1,62} = 0,328$ ,  $P = 0,57$ ). Por otro lado, se observó una relación positiva significativa entre el peso de los metamorfos y la duración del humedal ( $R^2 = 0,929$ ;  $F_{1,20} = 126,88$ ,  $P < 0,001$ ), siendo menor el peso de los metamorfos en los humedales de menor duración.

Figura 10. Tiempo a la metamorfosis y peso de los metamorfos de *Pleurodema thaul* en relación con el hidroperíodo de tres humedales (Pinar de Festa, Laguna Fantasma y Laguna Teleférico).

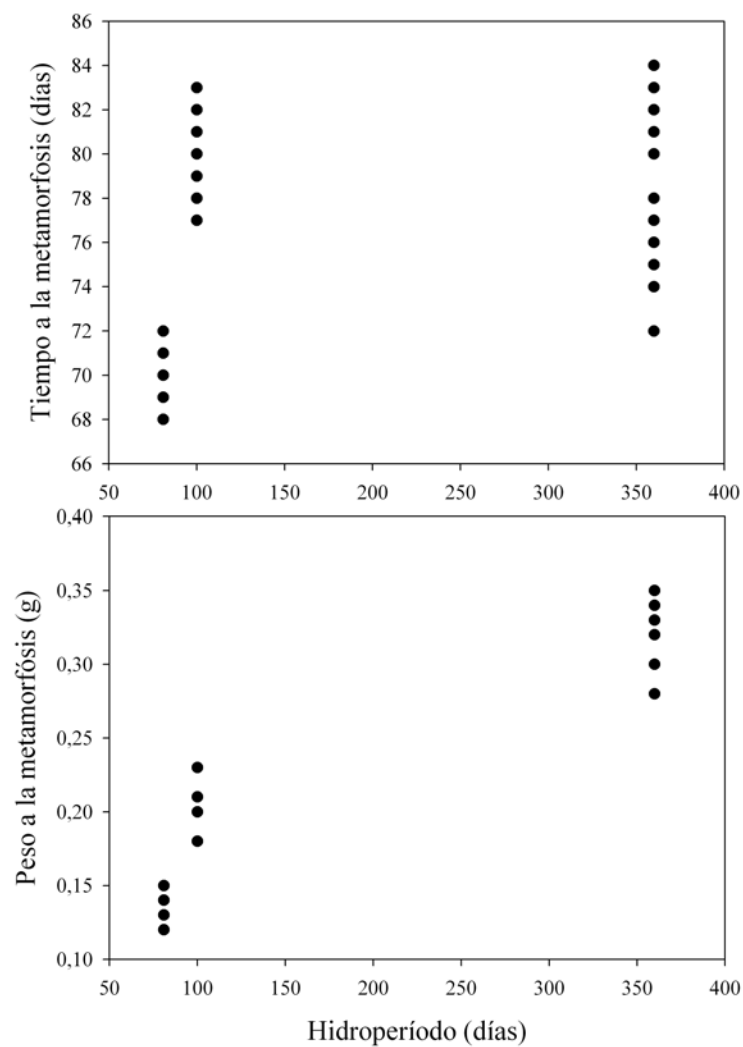
La duración del hidroperíodo de cada humedal se indica en la Tabla I.



**Figura 11.** Figura 10. Tiempo a la metamorfosis y peso de los metamorfos de *Pleurodema bufoninum* en relación con el hidroperíodo de los humedales de la localidades Arroyo Bernal y Río Ñirihuau. La duración del hidroperíodo de cada humedal se indica en la Tabla I.



**Figura 12.** Tiempo a la metamorfosis y peso de los metamorfos de *Rhinella spinulosa* en relación con el hidroperíodo de los tres humedales de la localidad del Arroyo Ñireco. La duración del hidroperíodo de cada humedal se indica en la Tabla I.



### Trabajo experimental

*Especies de Pleurodema.* Los regímenes de temperatura a la cual estuvieron sometidos los renacuajos fueron similares en ambos tratamientos (Fig. 13). El efecto del bloque no fue significativo sobre ninguna de las variables respuesta medidas, por lo tanto fue excluido de los análisis ( $P > 0,08$  para todos los casos). Al surgir el primer renacuajo en estadio 42 (día 32) se encontraron diferencias significativas en el estadio de desarrollo alcanzado por los renacuajos entre especies, pero no entre tratamientos de volumen de agua (especie  $F_{1,21} = 68,17$ ,  $P < 0,001$ ; volumen de agua  $F_{1,21} = 0,44$ ,  $P = 0,51$ ). Los renacuajos de *Pleurodema thaul* estuvieron en estadios menos avanzados que los renacuajos de *P. bufoninum*. Se observaron diferencias significativas en el peso de los renacuajos tanto entre especies como así también entre tratamientos de volumen de agua (especie  $F_{1,21} = 42,01$ ,  $P < 0,001$ ; volumen de agua  $F_{1,21} = 12,37$ ,  $P = 0,003$ ). Los renacuajos de *Pleurodema thaul* alcanzaron un mayor peso que los de *P. bufoninum*. Para ambas especies los renacuajos del tratamiento de volumen variable de agua fueron de menor peso que los renacuajos del tratamiento de volumen estable.

En cuanto a las características de la metamorfosis (supervivencia, tiempo y peso del metamorfo), se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los metamorfos entre especies de *Pleurodema* y entre tratamientos de volumen de agua (especie  $F_{1,20} = 9,55$ ,  $P = 0,008$ ; volumen de agua  $F_{1,20} = 6,98$ ,  $P = 0,02$ ). La supervivencia fue menor en *P. thaul* en el tratamiento de reducción de volumen de agua, y en *P. bufoninum* los tratamientos no afectaron la supervivencia de los metamorfos (Fig. 14). Se observó que el tiempo en culminar la metamorfosis fue diferente entre especies y entre tratamientos de volumen de agua (especie  $F_{1,20} = 7,84$ ,  $P = 0,015$ ; volumen de agua  $F_{1,20} = 17,27$ ,  $P < 0,001$ ). El tiempo en completar la metamorfosis fue menor en *Pleurodema bufoninum* y más largo en *P. thaul*. Para las dos especies, el tiempo en completar la metamorfosis fue más corto en el tratamiento de volumen variable (Fig. 14). El peso de los metamorfos no fue diferente entre especies pero sí entre



tratamientos de volumen de agua (especie  $F_{1, 20} = 1,41$ ,  $P = 0,25$ ; volumen de agua  $F_{1, 20} = 12,30$ ,  $P = 0,003$ ). El peso de los metamorfos del tratamiento de volumen variable fue menor que el peso de los metamorfos del tratamiento de volumen estable (Fig. 14).

***Rhinella spinulosa***. El régimen de temperatura que experimentaron los renacuajos de los dos tratamientos fue similar (Fig. 15). El primer estadio 42 fue observado a los 37 días de iniciado el experimento en el tratamiento de volumen variable. A esta fecha se observaron diferencias en el peso de los renacuajos entre los tratamiento de volumen de agua, alcanzando mayor peso los renacuajos del tratamiento de volumen estable ( $VE = 0,262 \text{ g} \pm 0,02 \text{ g}$ ;  $VV = 0,21 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ ,  $t = 2,18$ ,  $P = 0,043$ ). No se observaron diferencias en el estadio de desarrollo de los renacuajos entre tratamientos de volumen ( $VE = 36,3 \pm 0,282$   $VV = 37,2 \pm 0,56$ ,  $t = 1,5$ ,  $P = 0,149$ ).

En cuanto a las características de la metamorfosis, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia a la metamorfosis entre tratamientos ( $VE = 60 \% \pm 8,4 \%$ ,  $VV = 80 \% \pm 5,3 \%$ ,  $t = 1,88$ ,  $P = 0,07$ ). Por el contrario se observaron diferencias en el tiempo en culminar la metamorfosis, siendo menor en el tratamiento de reducción de volumen de agua ( $VE = 57 \text{ días} \pm 2 \text{ días}$ ,  $VV = 49 \text{ días} \pm 3 \text{ días}$ ,  $t = 2,3$ ,  $P = 0,03$ ) (Fig. 14). No se observaron diferencias en el peso del metamorfo entre tratamientos de volumen ( $VE = 0,102 \text{ g} \pm 0,006 \text{ g}$ ;  $VV = 0,113 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ ,  $t = 0,984$ ,  $P = 0,34$ ) (Fig. 14).

Figura 13. Temperatura semanal (promedio  $\pm$  ES) durante noviembre y diciembre de 2006, en los experimentos de plasticidad en respuesta al hidropériodo para *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum*. Los datos fueron registrados cada hora con data loggers.

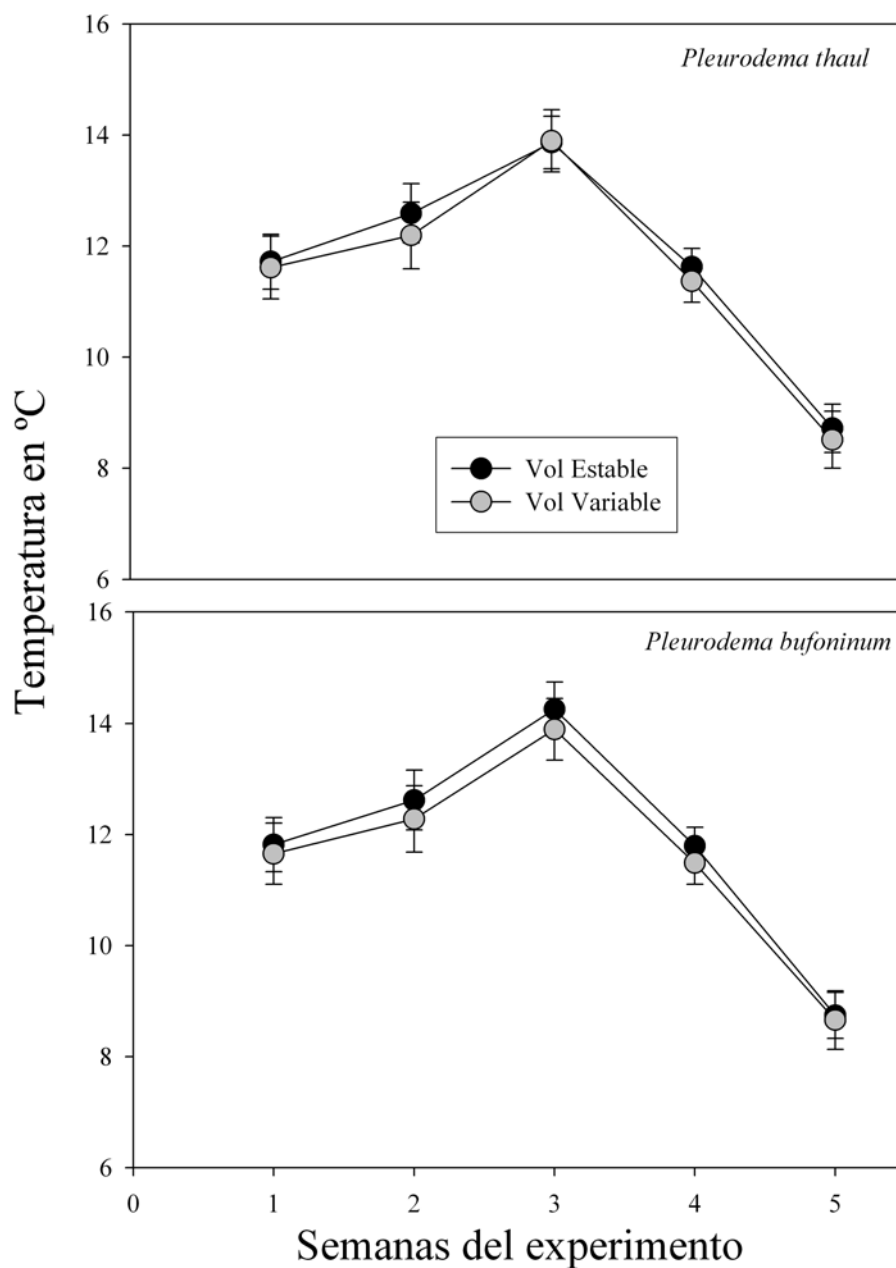


Figura 14. Respuestas en la metamorfosis (supervivencia, tiempo y peso) de las tres especies de anuros en el tratamiento de volumen de agua. Se muestra la media  $\pm$  ES. \* Diferencias significativas  $P < 0,05$ ).

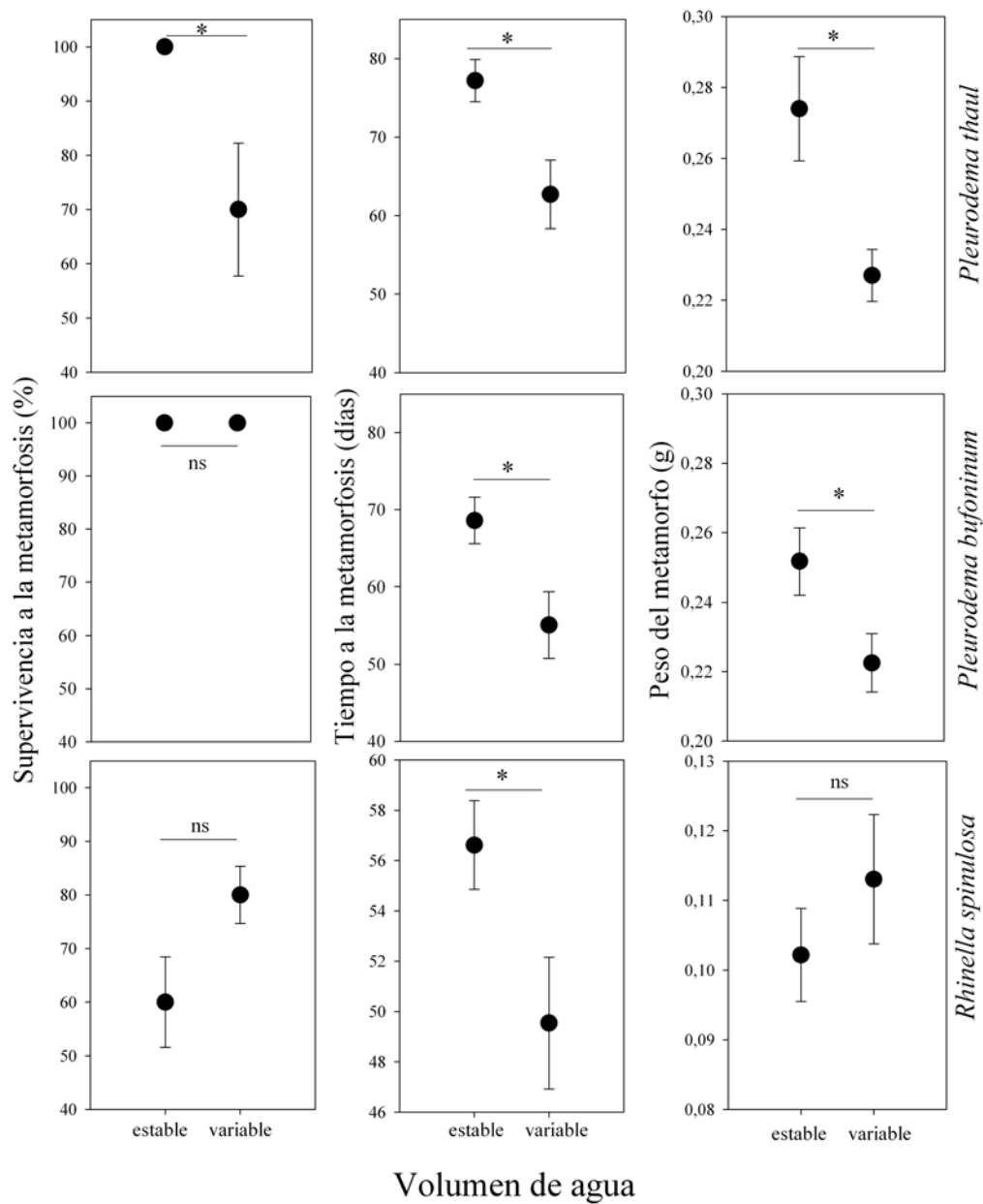
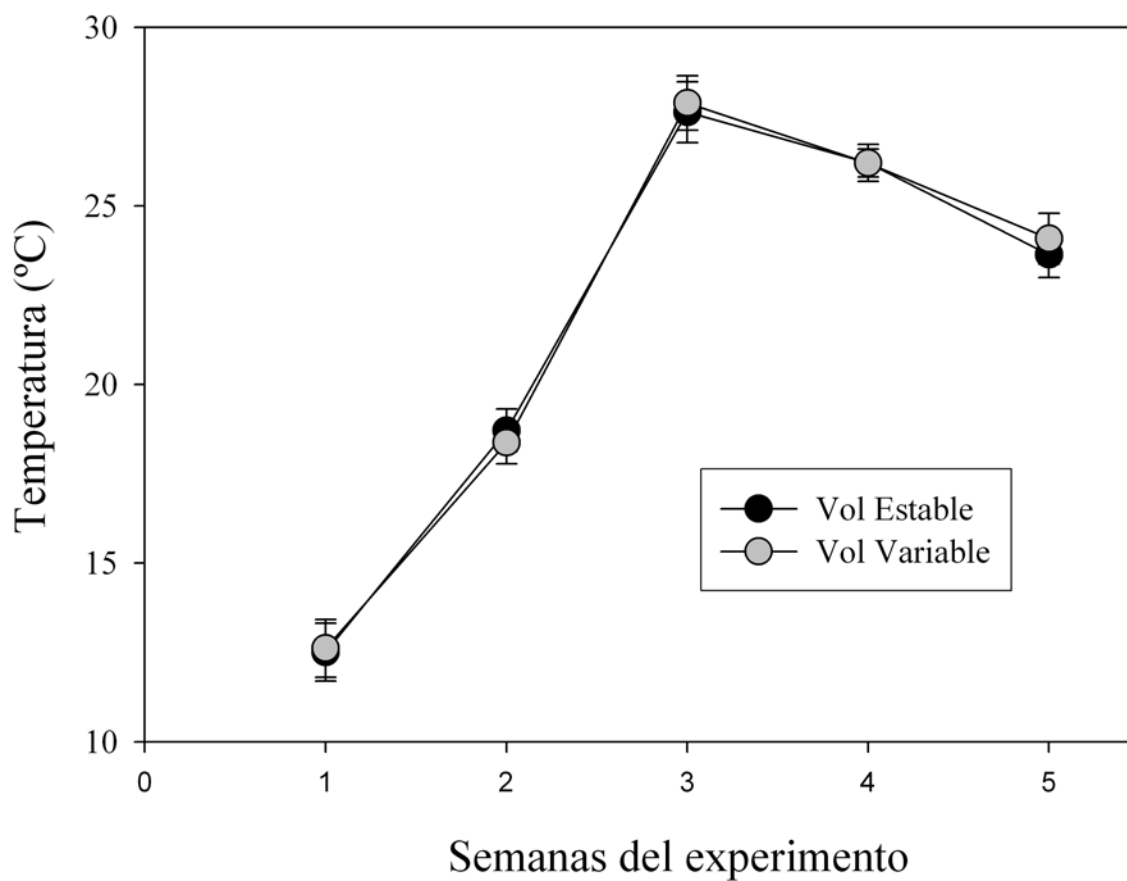
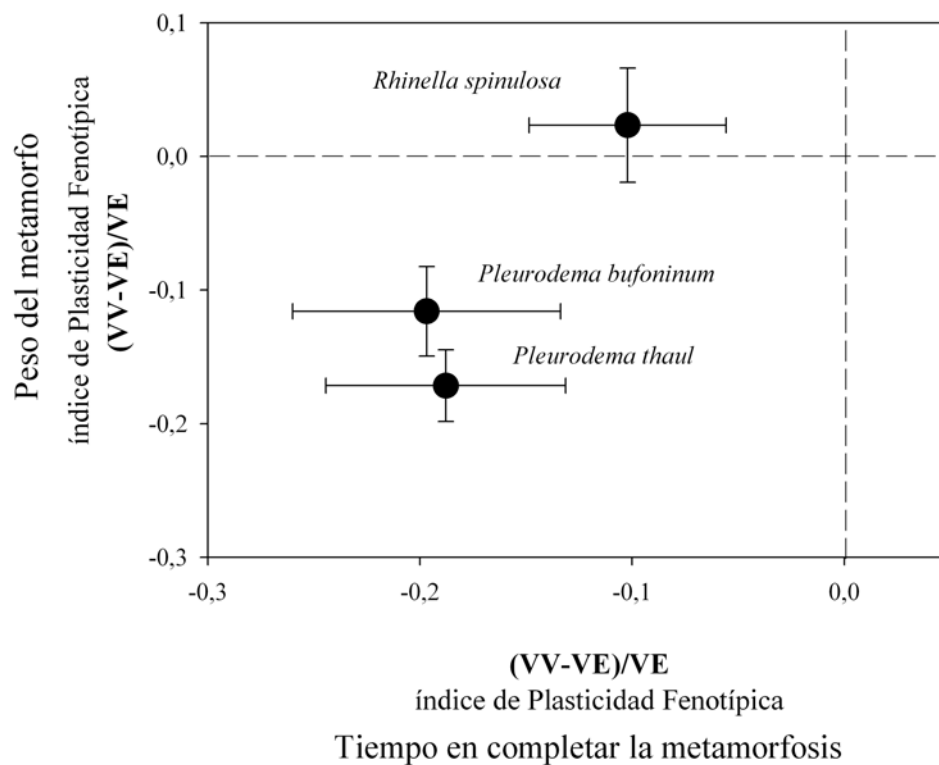


Figura 15. Temperatura semanal (promedio  $\pm$  ES) durante noviembre y diciembre de 2007, en los experimentos de plasticidad en respuesta al hidroperíodo para la especie *Rhinella spinulosa*. Los datos fueron registrados diariamente a las 12:00 y las 17:00 horas con termómetro digital.



**Índice de Plasticidad Fenotípica.** Se observaron diferencias entre las especies de anuros en el índices de plasticidad para el peso de los metamorfos pero no sobre el mismo índice calculado para el tiempo a la metamorfosis (peso a la metamorfosis ANOVA  $F_{2, 15} = 7,46$ ,  $P = 0,006$ ; tiempo a la metamorfosis  $F_{2, 15} = 0,967$ ,  $P = 0,58$ ) (Fig. 16). *Pleurodema bufoninum* y *P. thaul* mostraron índices de plasticidad similares en el peso del metamorfo pero difirieron significativamente respecto de *Rhinella spinulosa* (*P. bufoninum* vs. *R. spinulosa* y *P. thaul* vs *R. spinulosa*, test de Bonferroni  $P < 0,001$  para ambas comparaciones) (Fig. 16).

Figura 16. Índice de Plasticidad fenotípica tomado de Richter-Boix *et al.* (2006) calculado para el tiempo en completar la metamorfosis y para el peso del metamorfo (media  $\pm$  ES) para las tres especies de anuros. Las líneas seccionadas indican valores del índice cuando no existe plasticidad. VE tratamiento de volumen estable, VV tratamiento de volumen variable.



## DISCUSIÓN

Muchos anfibios emplean parte de su ciclo vida complejo o bifásico para explotar ambientes temporarios. Debido a que poseen una fase larvaria de vida acuática y un juvenil y adulto terrestres, pueden particionar su crecimiento entre ambas fases (Wibur & Collins, 1973). Las especies de anuros estudiadas aquí habitan mayormente ó predominantemente ambientes temporarios. La mayor parte de su vida la invierten en el crecimiento asociado a la fase terrestre de su ciclo de vida, ya que el crecimiento durante la fase larvaria solo se extiende por unos pocos meses. Su desarrollo y crecimiento como larvas o renacuajos está en parte restringido o supeditado a la duración del hidropériodo de los cuerpos de agua, que en la mayoría de los casos culmina a comienzos del verano, cuando se secan completamente. Como hemos observado, los eventos reproductivos de los anuros estudiados también se limitan al hidropériodo de los humedales, determinando estaciones reproductivas más largas y continuas en aquellos humedales de mayor duración.

Se ha establecido que las diferencias en el éxito de las especies para sobrevivir en ambientes temporarios podría estar relacionada a variaciones en la plasticidad fenotípica, la cual permite que algunas especies por ejemplo, aceleren la metamorfosis cuando el ambiente comienza a secarse (Wilbur, 1987, Crump, 1989, Newman, 1989; Denver *et al.*, 1998; Loman, 1999; Loman & Claesson, 2003). En este trabajo se observaron diferencias en el tiempo de metamorfosis y en el peso del metamorfo en condiciones naturales y experimentales en las tres especies de anuros estudiadas, *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*. El patrón observado indica que estas especies poseen cierto grado de plasticidad en su desarrollo y crecimiento. Las respuestas plásticas encontradas en las especies estudiadas aquí, revelan ciertas similitudes entre los géneros *Pleurodema* y *Rhinella*. En condiciones naturales tanto el desarrollo larvario como el peso de los metamorfos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* mostraron estar relacionados con el hidropériodo de los humedales. Estas dos especies presentaron períodos de

desarrollo más cortos y metamorfos más pequeños en ambientes con hidroperíodos más cortos. En el caso de *Rhinella spinulosa* se observó que el desarrollo larvario no estuvo asociado con el hidroperíodo de los humedales pero sí el peso de los metamorfos, siendo menor en humedales de menor duración. Estas respuestas también se han observado en otras especies de anuros del hemisferio norte (Wilbur, 1987; Crump, 1989; Newman, 1989; Tejedo & Reques, 1994; Brady & Griffiths, 2000; Richter-Boix *et al.*, 2006). Sin embargo en condiciones naturales, otros factores además del hidroperíodo podrían influenciar dichas respuestas, como la presencia de depredadores, el incremento de la temperatura, el incremento de la densidad y la competencia por recursos (Newman, 1992; Wilbur, 1997). El incremento de temperatura fue notable en los ambientes, con una mayor amplitud térmica de la temperatura en humedales más pequeños y someros (Capítulo I, Fig. 9). También la densidad de renacuajos es mayor en ambientes más pequeños, por lo que este factor también podría tener influencia en los resultados observados en condiciones naturales. Sin embargo el efecto de la densidad podría no ser un factor tan crucial para el desarrollo de *Rhinella spinulosa*, debido a que esta especie aun en ambientes permanentes se encuentra en altas densidades ya que sus renacuajos muestran un patrón de agregación (Jara *et al.*, 2006). También este hecho ha sido observado en otras especies de bufónidos cuyas cohortes larvarias se desarrollan típicamente a altas densidades poblacionales (Richter-Boix *et al.*, 2006). Al respecto, otros autores han expuesto que especies de la familia Bufonidae no responden plásticamente al hidroperíodo en bajas densidades pero sí a altas densidades, siendo el tiempo a la metamorfosis más corto en los tratamientos de desecación (Wilbur, 1987; Richter-Boix *et al.*, 2006). Futuros estudios de plasticidad de *R. spinulosa*, deberán incluir como otro factor (además del hidroperíodo) a la densidad poblacional.

Bajo condiciones experimentales los renacuajos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* respondieron a una reducción en el volumen de agua completando su desarrollo en menor tiempo y con un metamorfo de menor peso. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores (*e. g.* Loman, 1999). Por otro lado, los renacuajos de *Rhinella spinulosa* respondieron a

una reducción en el volumen de agua completando su desarrollo en un tiempo más corto que en el tratamiento de volumen estable. Sin embargo el tamaño del metamorfo no se vio modificado por el tratamiento. En otros estudios realizados sobre otras especies de bufónidos (Richter-Boix *et al.*, 2006) no se observaron diferencias en el tiempo de desarrollo cuando los renacuajos fueron expuestos a diferentes tratamientos de hidroperíodo. Por otro lado, en condiciones naturales se observaron diferencias entre tamaños de los metamorfos de *R. spinulosa*, siendo más grandes en humedales de mayor duración. Estos resultados opuestos podrían indicar que las respuestas al hidroperíodo no involucran cambios en el tamaño a la metamorfosis en esta especie y que aquellas diferencias observadas en el campo son producto de otros factores como la depredación y la calidad del alimento (Kupferberg, 1997; Wilbur, 1997). Por otro lado puede que esta población *R. spinulosa* requiera un tamaño mínimo en la fase larval para poder completar la metamorfosis como ha sido observado en otros trabajos (*e. g.* Sanuy *et al.*, 2008).

Como otros autores han establecido, los diseños experimentales de hidroperíodo en tanques o contenedores muestran que la temperatura tendría cierto efecto sobre los resultados de los experimentos. Estos efectos son planteados y discutidos en el trabajo de Loman (1999). El desarrollo de los anfibios está íntimamente relacionado a la temperatura ya que los cambios morfológicos y fisiológicos en esta etapa del ciclo de vida dependen fuertemente de la temperatura (Ultsch *et al.*, 1999). Renacuajos que crecen a bajas temperaturas tienen desarrollos larvarios más prolongados y alcanzan un tamaño a la metamorfosis mas grande, lo que es considerado una regla general para los organismos ectotermos (Harkey & Semlitsch, 1988; Atkinson, 1996; Sanuy *et al.*, 2008). Por el contrario un incremento en la temperatura resulta en un aceleramiento del desarrollo y del crecimiento, alcanzando más rápidamente la metamorfosis y un peso menor a la metamorfosis (Harkey & Semlitsch, 1988; Ultsch *et al.*, 1999; Álvarez & Nicieza, 2002; Sanuy *et al.*, 2008). En los contenedores usados en este trabajo las diferencias de volumen entre los tratamientos no fueron lo suficientemente grandes para generar diferencias significativas en el régimen de temperaturas entre tratamientos. Otros autores han conducido sus



experiencias de hidroperíodo con tratamientos de volúmen muy diferentes por lo que la temperatura tendría un efecto más importante que en los experimentos realizados en el presente trabajo (Tejedo & Reques, 1994; Loman, 1999). Si bien la densidad poblacional se incrementa respecto al volumen en el tratamiento de reducción de volumen de agua, las densidades usadas en este trabajo son bajas con respecto a las densidades en la naturaleza y las usadas en otros experimentos (Jara, 2002; Jara *et al.*, 2007). En la naturaleza hemos observado que las densidades de *Pleurodema thaul* pueden oscilar entre 1 a 4 renacuajos/litro, en *P. bufoninum* entre 2 a 6 ind/litro y en *Rhinella spinulosa* entre 10 a 50 renacuajos/litro, por lo que se afirma que el efecto de la densidad poblacional no habría influenciado nuestros resultados.

El incremento de metabolitos como el amonio, la reducción en el espacio de natación y la disminución en la columna de agua podrían ser tomados como señales por los renacuajos para determinar cuándo acelerar el desarrollo (Denver *et al.*, 1998; Morey & Resnick, 2004). Son necesarios futuros estudios que analicen en estas especies, qué señales del ambiente emplean los renacuajos para determinar que su ambiente comienza a secarse y por lo tanto acelerar el desarrollo. Estos estudios son esenciales para determinar los mecanismos fisiológicos asociados a la plasticidad.

Poseer un desarrollo rápido fijado genéticamente podría no conferir un valor de eficacia biológica alto en ambientes de hidroperíodo fluctuante, debido a que un crecimiento extra en ambientes de mayor duración sería desaprovechado (Newman, 1992). Las especies estudiadas aquí muestran que bajo condiciones naturales su desarrollo demanda entre dos y tres meses o más en ambientes de mayor duración. Esto permite que estos anuros aprovechen al máximo el crecimiento en la fase larvaria, pudiendo alcanzar mayor tamaño a la metamorfosis en ambientes con mayor hidroperíodo. La importancia del tamaño a la metamorfosis ha sido extensamente analizada en diferentes trabajos tanto en anfibios como en otros organismos que presentan metamorfosis. Un mayor tamaño de metamorfo incrementaría la eficacia biológica, aumentando las probabilidades de supervivencia en el ambiente terrestre, adelantando la edad a la madurez

sexual, o aumentando el tamaño del adulto (Semlitsch *et al.*, 1988; Berven, 1990; Taylor *et al.*, 1998; Peckarsky *et al.*, 2001; Altwegg & Reyer, 2003). Por lo tanto la plasticidad del desarrollo y del crecimiento en renacuajos de *Pleurodema* y *Rhinella* les conferiría un mejor desempeño en estos ambientes con variaciones en el hidroperíodo tanto anuales como interanuales, que si tuvieran un desarrollo fijo, ya sea rápido o lento.

Finalmente, los índices de plasticidad fenotípica nos indican que especies emparentadas como *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum*, poseen grados de plasticidad similares, pero diferentes con respecto a la plasticidad de una especie no emparentada como *Rhinella spinulosa*. Estas diferencias podrían estar asociadas con la historia evolutiva de cada una de ellas debido a que son dos géneros muy distantes filogenéticamente. Por otro lado las especies estudiadas aquí, pueden desarrollarse y metamorfosear en una variedad de humedales que difieren ampliamente en su hidroperíodo. Además *Pleurodema bufoninum* y *Rhinella spinulosa* hacen uso frecuente de los mismos hábitats para el desarrollo larval, y sin embargo muestran diferencias notables en sus respuestas al hidroperíodo. Sería interesante entonces estudiar las respuestas frente al hidroperíodo en otras especies más cercanas de la familia Bufonidae presentes en la zona como *Nannoprhyne variegata* y *Rhinella rubropunctata*, para establecer si hay similitud con el patrón encontrado en *R. spinulosa*.

## CAPÍTULO III

DEPREDACIÓN DE RENACUAJOS DE *PLEURODEMA* Y *RHINELLA*

## POR INSECTOS ACUÁTICOS

## INTRODUCCIÓN

Estudios sobre la ecología de renacuajos en sus hábitats naturales sugieren que la depredación es una de las principales fuentes de mortalidad (Heyer *et al.*, 1975; Morin, 1983, 1985; Skelly, 1996; Wilbur, 1997; Alford, 1999; Eterovick & Sazima, 2000; Toledo, 2003; Vonesh, 2003). La depredación en anfibios comienza desde la fase de huevo y se extiende a lo largo de toda la vida del individuo (Formanowicz *et al.*, 1981; Wilbur, 1980; Warkentin, 2000; Toledo, 2003; Vonesh, 2003). Los renacuajos son vulnerables a un amplio rango de depredadores invertebrados y vertebrados (Heyer *et al.*, 1975; Crump & Vaira, 1991; Alford, 1999; Toledo, 2003; Jara & Perotti, 2004, 2009; Jara, 2008 a y b). Entre los depredadores más importantes de anfibios se citan a los peces y a los insectos acuáticos (Heyer *et al.*, 1975; Morin, 1983; Petranka *et al.*, 1987; Wilbur, 1987; Alford, 1999; Toledo, 2003).

En ambientes que carecen naturalmente de peces los insectos son importantes depredadores de renacuajos; muchos de ellos pueden consumir renacuajos de gran tamaño debido a que no están limitados por el tamaño de la boca (“gape-limited”) (Urban, 2007). Estos depredadores no tragan a sus presas enteras (como peces y anfibios). Las presas son consumidas parcialmente por insectos con aparatos bucales succionadores, como notonéctidos y belostomátidos, o bien son trituradas y luego consumidas por insectos con aparatos bucales masticadores, como coleópteros y odonatos. No obstante, la mayoría de la evidencia sugiere que los renacuajos pequeños o tempranos son los más susceptibles a ser depredados (Alford, 1999). La relación entre

el tamaño del depredador y el tamaño de la presa suelen ser fundamentales para determinar el éxito de captura en algunos insectos acuáticos (Brodie & Formanowicz, 1983; Travis *et al.*, 1985; Richard & Bull, 1990; Lardner & Loman, 1995). La palatabilidad de los renacuajos también juega un rol importante en la susceptibilidad a la depredación. Por ejemplo, el desarrollo de sustancias tóxicas es un carácter común dentro de la familia Bufonidae como fue comprobado para *Bufo* y *Rhinella* (Brodie & Formanowicz, 1987; Peterson & Blaustein, 1992; Lawler & Hero, 1997; Gunzburger & Travis, 2005; Jara & Perotti, 2006, 2009). Se ha visto que las toxinas que presentan algunas especies de estos géneros son particularmente eficientes para algunos depredadores insectos (náyades de odonatos y larvas de coleópteros) y vertebrados (peces y anfibios) (Formanowicz & Brodie, 1982; Kehr & Schnack, 1991; Lawler & Hero, 1997). También se ha observado que depredadores que succionan los fluidos de sus presas como los insectos heterópteros, resultan menos afectados por las defensas químicas de los renacuajos que aquellos depredadores de tipo masticador (Kruse & Stone, 1984; Peterson & Blaustein, 1992). Esto se debe a que los depredadores que trituran o mastican a sus presas antes de ingerirlas, entran en contacto con las toxinas contenidas en la piel de los renacuajos.

Brodie *et al.* (1978) y Brodie & Formanowicz (1987) observaron que las larvas de *Bufo americanus* no son palatables para náyades de odonatos en estadios larvarios tempranos (estadios 22 a 30 *sensu* Gosner 1960) y tardíos (46 *sensu* Gosner 1960). Sin embargo se observó que estadios larvarios intermedios (30 a 33 de Gosner 1960) fueron palatables para estos depredadores. Lawler & Hero (1997) por su parte demostraron que las larvas de *Bufo marinus* no son palatables en el rango de estadios 25 al 41 para un depredador pez. Estos resultados demuestran que la ontogenia de la palatabilidad en el género *Bufo* presenta variabilidad y que ésta depende del tipo de depredador. Para las

especies de Patagonia, hasta el momento ha sido demostrado que los renacuajos de *Rhinella spinulosa* resultan no palatables para varios insectos acuáticos depredadores (Jara & Perotti, 2006).

En la Patagonia en particular y en Argentina en general, pocos trabajos han analizado las interacciones entre anfibios y sus depredadores (Kehr & Schnack, 1991; Cuello *et al.*, 2005; Casanovas & Úbeda, 2006; Jara & Perotti, 2004, 2006, 2009; Perotti *et al.*, 2006; Scarabotti *et al.*, 2007), y las implicancias de estas interacciones en la ecología de las especies como por ejemplo las defensas que los renacuajos desarrollan para evitar la depredación o para disminuir su impacto (Jara & Perotti, 2006, 2009; Scarabotti *et al.*, 2007; Kehr & Gómez, 2009). Los objetivos de este estudio en relación a la depredación sobre larvas de anuros fueron: 1) conocer la composición del ensamble de insectos acuáticos depredadores, sus abundancias relativas y la fenología dentro del área de estudio y 2) estudiar bajo condiciones experimentales la supervivencia de los renacuajos de *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* teniendo en cuenta el tamaño de los renacuajos, la palatabilidad y los depredadores más frecuentes y abundantes.

Las hipótesis a testear y las predicciones correspondientes del segundo objetivo fueron:

Hipótesis 1: la supervivencia de los renacuajos de las especies *Pleurodema thaul*, *Pleurodema bufoninum* y *Rhinella spinulosa* es tamaño-dependiente.

Predicción: los renacuajos de menor tamaño mostrarán menor supervivencia cuando sean expuestos a la depredación que los renacuajos de mayor tamaño, debido a la dificultad que se presenta para los depredadores capturar y manipular presas más grandes.

Hipótesis 2: la supervivencia de los renacuajos depende de su palatabilidad relativa para cada depredador.

Predicción: los renacuajos menos palatables presentaran una mayor supervivencia que aquellos renacuajos palatables al ser expuestos a depredadores masticadores.

## METODOLOGÍA

### **Trabajo de campo**

*Ensamble de depredadores insectos, abundancias relativas y fenología.* Cada cuerpo de agua fue muestreado entre los meses de septiembre a enero. El método de muestreo empleado fue de barrido del cuerpo de agua con red de mano o “pond-net sweeping” (Oertli *et al.*, 2005), uno de los métodos más usados en el muestreo de invertebrados acuáticos de ambientes lénticos. En cada humedal se identificaron los diferentes microhábitats vegetados y dentro de cada uno se muestrearon sitios al azar. Solo se muestrearon áreas vegetadas ya que muestreos piloto previos mostraron la ausencia de macroinvertebrados en áreas sin vegetación. El número de redeadas fue determinado a partir del área de cada laguna, siendo de 30 redadas en lagunas  $> 1.000 \text{ m}^2$ , de 15 redadas en lagunas entre  $1.000 \text{ m}^2$  y  $100 \text{ m}^2$ , y de 5 redadas en lagunas  $< 100 \text{ m}^2$ . En cada punto se pasó horizontalmente una red de copo con mango de boca rectangular (36 x 25 cm, 1 mm de poro) a lo largo de 1 m lineal abarcando el fondo y la columna de agua. En lagunas muy someras (profundidad menor a 30 cm) se empleó una red más pequeña (15 x 15, 1 mm de poro). El contenido de la red fue volcado en una bandeja de plástico de 40 x 30 x 20 cm. Se separaron los insectos depredadores, se contabilizaron y se registró su longitud total utilizando un calibre digital (0,01 mm). En el caso de los coleópteros solo se contabilizaron estadios larvarios ya que de las especies presentes en el área de estudio, son los únicos estadios del ciclo de vida que depredan efectivamente

sobre renacuajos (Jara, *obs. pers.*). Parte del material colectado fue fijado en el campo con alcohol 70% para su posterior determinación; el resto de los especímenes fueron liberados al finalizar el muestreo.

Para los cuatro depredadores más comunes se construyó una tabla de distribución de tallas.

Se cálculo la riqueza de insectos depredadores como el número de especies de insectos acuáticos por humedal (Begon *et al.*, 2006). La densidad de cada especie o género de insectos depredadores fue expresada como individuos/m<sup>3</sup>. Con estas densidades se cálculo la abundancia relativa de las especies de depredadores en cada humedal durante los meses de muestreo para establecer posibles variaciones estacionales (fenología) y espaciales en las abundancias de insectos depredadores en el área de estudio. Se evaluó si el área máxima, la profundidad máxima y la complejidad estructural del humedal (medida como el número de especies de macrófitas por humedal) estan relacionadas con la riqueza de especies de insectos depredadores mediante una regresión lineal múltiple (MLR) (SigmaStat).

***Ensamble de anuros.*** Para cada humedal se registró la presencia de anuros a través del monitoreo de los humedales a lo largo de la primavera. La ocurrencia de una especie en cada humedal fue determinada a partir de la presencia de oviposturas y de renacuajos de cada especie siguiendo las descripciones realizadas por Úbeda (1998). La presencia y determinación de las oviposturas se realizó mediante el recorrido de los humedales en toda su extensión y la determinación de la presencia de renacuajos en cada humedal se realizó mediante muestreos con redes de mano, cuya metodología se describe en el Capítulo II.

### Trabajo experimental

Para cuantificar de qué manera el tamaño influencia la vulnerabilidad de los renacuajos de *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*, se expusieron renacuajos de dos tallas de cada especie de anuro a la depredación directa de los 4 insectos depredadores más comunes. Las tallas de renacuajos y los estadios de desarrollo de cada especie de anuro se presentan en la Tabla I. Las tallas de los depredadores utilizados fueron: *Notonecta vereertbruggheni* (12,24 mm  $\pm$  0,62 mm), *Rhantus antarcticus* (25,21 mm  $\pm$  1,76 mm), *Belostoma bifoveolatum* (25,73 mm  $\pm$  1,04 mm) y *Rhionaeschna variegata* (34,93 mm  $\pm$  1,77 mm).

Tabla I. Tallas de renacuajos y estadios del desarrollo de las tres especies de anuros empleadas en los experimentos de depredación. Estadios del desarrollo *sensu* Gosner (1960).

Especie de anuro	Talla media $\pm$ ES	Estadios
<i>Pleurodema thaul</i>	14,08 mm (0,12 mm)	26-27
	31,5 mm (0,5 mm)	31-32
<i>Pleurodema bufoninum</i>	12,1 mm (0,2 mm)	26-27
	32 mm (0,28 mm)	30-32
<i>Rhinella spinulosa</i>	11,60 mm (0,09 mm)	24-26
	22,9 mm (0,18 mm)	34-36



**Preparación y monitoreo del experimento.** Se colectaron 4 oviposturas de cada especie provenientes de la Laguna Fantasma en el caso de *Pleurodema thaul* y del humedal 1 de la localidad del Ñireco para *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*. Todas las oviposturas fueron colocadas en recipiente con agua y se mantuvieron en un cuarto bajo condiciones de fotoperíodo y temperatura controlados hasta la eclosión (12:12 L-O;  $18 \pm 1$  °C). La luz del cuarto fue proporcionada por 4 lámparas fluorescentes Philips daylight TLT 40W/54RS. Después de la eclosión, las larvas de diferentes oviposturas fueron mezcladas y mantenidas en un predio externo al laboratorio de Fotobiología (INIBIOMA-CRUB, CONICET) en contenedores con agua de arroyo y alimentados con un cultivo de algas y alimento para peces hasta alcanzar el estadio de desarrollo deseado para iniciar los experimentos (tabla I).

Se empleó un diseño factorial de tres vías: especie de renacuajo (3 niveles), talla del renacuajo (2 niveles) y especie de depredador (4 niveles). Cada combinación de los tratamientos (24 en total) fue replicada 5 veces, totalizando 120 unidades experimentales.

Las unidades experimentales fueron recipientes circulares opacos de 1 litro de capacidad que contenían 5 renacuajos y un depredador en los tratamientos con depredador. Además en cada recipiente se colocó una varilla de plástico para que el depredador pudiera usarla como superficie de agarre o percha. El experimento fue conducido en un cuarto con fotoperíodo y temperatura controlados (12:12 L-O;  $18$  °C  $\pm$  1 °C). La luz del cuarto fue proporcionada por 4 tubos fluorescentes Philips daylight TLT 40W/54RS. Al cabo de 2 horas de comenzado el experimento, se registró la supervivencia en cada recipiente.

*Análisis estadísticos.* La supervivencia expresada como la proporción de renacuajos vivos en cada unidad experimental fue analizada mediante un ANOVA de tres vías para un diseño balanceado de factores fijos. El test de Bonferroni fue empleado para las comparaciones múltiples.

## RESULTADOS

### Trabajo de campo

***Riqueza y Diversidad de especies de insectos depredadores.*** Las especies de insectos acuáticos depredadores encontradas en los humedales del área de estudio se muestran en la Tabla II. La riqueza de especies varió entre 0 y 9 especies por humedal. El humedal permanente de la localidad del Arroyo Ñireco (humedal 1) presentó la mayor riqueza de especies de insectos depredadores (Tabla II). Por otro lado, dos de los humedales estudiados (de área pequeña e hidropériodo efímero) no fueron colonizados por insectos depredadores (Tabla II). Los humedales relevados en la localidad del Arroyo Bernal fueron los más pobres en insectos acuáticos. Los únicos depredadores presentes en esta localidad fueron los coleópteros de los géneros *Rhantus* y *Tropisternus* (Tabla II). Los humedales de la localidad del Río Ñirihuau presentaron una riqueza de entre 3 y 7 especies de insectos depredadores por humedal, y tres de estas especies fueron halladas en los cuatro humedales de la localidad (Tabla II).

Los humedales situados dentro del Ejido Municipal de San Carlos de Bariloche (Laguna Teleférico, humedal Pinar de Festa, Laguna Fantasma y Arroyo Gutiérrez) presentaron diferencias en su riqueza de especies. La Laguna Fantasma y la Laguna Teleférico presentaron la mayor riqueza de especies (7 y 6 especies de insectos

depredadores respectivamente), seguidos por el humedal del Arroyo Gutiérrez y el humedal Pinar de Festa que presentó la menor riqueza de todos (Tabla II).

El modelo de regresión múltiple aplicado para medir la relación entre la riqueza de insectos con el área máxima, la profundidad máxima y la complejidad estructural del humedal fue significativo ( $F_{3,13} = 20,77$ ,  $P < 0,001$ ,  $R^2 = 0,827$ ). No todas las variables estuvieron relacionadas con la riqueza de especies de insectos; solo dos variables mostraron una relación significativa, la profundidad máxima del humedal (coeficiente = 2,16,  $P = 0,005$ ) y la complejidad estructural (coeficiente = 0,291,  $P = 0,002$ ). La mayor riqueza de insectos se observó en humedales más profundos y de mayor complejidad estructural (*i.e.* mayor número de especies de macrófitas).

***Presencia de las especies de anuros en el área.*** La especie de anuro con mayor frecuencia de ocurrencia en los humedales estudiados fue *Pleurodema bufoninum* y la de menor ocurrencia fue *Rhinella spinulosa* (Tabla II). Los renacuajos de *Pleurodema bufoninum* fueron encontrados tanto en humedales con baja riqueza de insectos depredadores (Localidad Arroyo Bernal) como en humedales con alta riqueza de depredadores (humedales de la localidad Río Ñirihuau, humedal 1 de la localidad Arroyo Ñireco, Tabla II). Los renacuajos de *Pleurodema thaul* estuvieron presentes en humedales con alta riqueza de insectos depredadores (Tabla II). Los renacuajos de *Rhinella spinulosa*, fueron encontrados en un humedal permanente con alta riqueza de insectos depredadores y en otros tres humedales temporarios con muy baja o nula riqueza de insectos depredadores (Tabla II).

Tabla II. Distribución de depredadores insectos y de anuros en los humedales del área de estudio (2005-2008). Pt: *P. thaul*, Pb: *Pleurodema bufoninum* y Rs: *Rhinella spinulosa*. Poner taxonomía

Localidad	Humedal	<i>Rhantus</i> sp.	<i>Lancetes</i> sp.	<i>Tropisternus</i> sp.	<i>Notonecta viriscens</i>	<i>Notonecta vereerbruggheni</i>	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	<i>Cyanallagma interruptum</i>	<i>Erythrodiplax</i> sp.	<i>Rhionaescha variegata</i>	Especie de anuro
Arroyo Bernal	1	•									Pb
	2	•		•							Pb
	3	•		•							Pb
	4	•									Pb
	5										Pb
	6	•									Pb
Río Ñirihuau	1	•	•	•		•	•	•		•	Pb + Pt
	2	•	•			•	•			•	Pb + Pt
	3	•				•	•	•		•	Pb
	4	•				•	•				Pb
Arroyo Ñireco	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Pb + Rs
	2	•									Pb + Rs
	3	•									Pb + Rs
	4										Rs
Laguna Teleférico		•		•	•	•	•		•		Pt
Laguna Fantasma		•	•			•	•	•		•	Pt
Humedal Pinar de Festa		•					•				Pt
Arroyo Gutiérrez		•			•			•	•	•	Pt + Pb

***Patrón temporal de ocurrencia de los insectos depredadores.*** Las especies de insectos depredadores más frecuentes en el área de estudio fueron *Rhantus antarcticus* (Coleoptera: Ditiscidae), *Notonecta vereertbruggheni* (Heteroptera: Notonectidae), *Belostoma bifoveolatum* (Heteroptera: Belostomatidae) y *Rhionaeschna variegata* (Odonata: Aeshnidae) (Tabla III, Fig. 1). Algunas características de la biología y ecología de estas cuatro especies se presentan en el Apéndice II. La fenología observada de los insectos presentes en los humedales temporarios, siguió un patrón temporal (Tabla IV). Las primeras especies que arribaron al ambiente fueron los notonéctidos, coleópteros y belostomátidos, mientras que hacia el final de la primavera se encontraron las primeras náyades de odonatos (Tabla IV). Los meses con mayor riqueza de insectos depredadores fueron noviembre, diciembre y enero (Tabla IV). La distribución de las tallas de los depredadores a lo largo del hidropériodo difirió entre especies (Tabla V). Para el género *Notonecta* la mayor variedad de tallas se observó en los meses de octubre y diciembre, durante los cuales coexistieron tanto estadios adultos como ninfales (Tabla V). Para la especie *Rhantus antarcticus* se observó una mayor variedad de tallas de larvas durante el mes de noviembre (Tabla V). Para el caso del belostomátido *Belostoma bifoveolatum* se observó que los adultos colonizan el cuerpo de agua a principios del mes de octubre (Tabla V). El período reproductivo ocurrió entre fines de octubre y principios de noviembre, con presencia de estadios ninfales hacia fines de noviembre (Tabla V). Estos estadios ninfales se desarrollaron y crecieron en tamaño durante diciembre y enero. La única especie de odonato anisóptero hallada en el área fue *Rhionaeschna variegata*. Los adultos de este odonato fueron observados en los humedales entre octubre y diciembre, dependiendo del año y del humedal estudiado. Las primeras náyades se detectaron entre octubre y noviembre (Tabla V). Se

desarrollaron en tamaño y estadio hasta finales del hidroperíodo (diciembre-enero, dependiendo del humedal) momento en el cual metamorfosearon a adultos voladores.

Figura 1. Insectos depredadores de los humedales del área de estudio: (A) *Rhantus* sp., (B) *Notonecta vereertbruggheni*, (C) *Belostoma bifoveolatum*, (D) *Rhionaeschna variegata*, (E) *Erythrodiplax* sp., (F) *Cyanallagma interruptum*.



Tabla III. Frecuencia de ocurrencia en el área de estudio y tamaño máximo alcanzado de los depredadores en los humedales muestreados. Los números en negrita muestran las especies más frecuentes. Frecuencia = N° de humedales donde fue encontrada la especie  $i$  / total de humedales estudiados.

Especie de depredador	Tamaño máximo (mm)	Frecuencia
<b>Heteroptera</b>		
<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	14	<b>0,44</b>
<i>Notonecta virescens</i>	9	0,22
<i>Belostoma bifobeolatum</i>	34	<b>0,39</b>
<b>Coleoptera</b>		
<i>Rhantus</i> sp.	30	<b>0,89</b>
<i>Lancetes</i> sp.	20	0,22
<i>Tropisternus</i> sp.	18	0,17
<b>Odonata</b>		
<i>Rhionaeschna variegata</i>	50	<b>0,39</b>
<i>Cyanallagma interruptum</i>	25	0,33
<i>Erythrodiplax</i> sp.	18	0,11

Tabla IV. Patrón de ocurrencia temporal de las especies de insectos depredadores en los humedales estudiados durante los períodos de muestreo.

Especie de insecto depredador	Meses de muestreo				
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
<i>Notonecta virescens</i>					
<i>Notonecta vereertbruggheni</i>					
<i>Belostoma bifobeolatum</i>					
<i>Tropisternus sp.</i>					
<i>Lancetes sp.</i>					
<i>Rhantus sp.</i>					
<i>Cyanallagma interruptum</i>					
<i>Rhionaeschna variegata</i>					



Tabla V. Distribución de tallas de los cuatro insectos depredadores más frecuentes y abundantes en los humedales temporarios muestreados a lo largo del hidropériodo Septiembre-Enero (año). Ad = adultos, ninf = estadios ninfales, nay = náyades.

Rango de tallas (mm)	<i>Notonecta</i>					<i>Rhantus antarcticus</i>					<i>Belostoma bifoveolatum</i>					<i>Rhionaeschna variegata</i>					
	Sep	Oct	Nov	Dic	Enero	Sep	Oct	Nov	Dic	Enero	Sep	Oct	Nov	Dic	Enero	Sep	Oct	Nov	Dic	Enero	
(30-40)																					nay
(20-30)											Ad										nay
(10-20)	Ad												ninf								nay
(0-10)		ninf				larva						ninf									nay

**Abundancias relativas de depredadores.** Las abundancias relativas de los insectos depredadores variaron tanto temporalmente como espacialmente. Los coleópteros fueron los únicos insectos en los humedales de la localidad del Arroyo Bernal, siendo el género *Rhantus* el más abundante de todos (Fig. 2). En la localidad del Río Ñirihuau los coleópteros representados por el género *Rhantus* fueron los únicos depredadores presentes en el mes de octubre en los humedales 1 y 4, pero a partir de noviembre aparecieron, con diferentes abundancias en los diferentes humedales, notonéctidos (*Notonecta veerertbrughenni*), belostomátidos (*Belostoma bifoveolatum*) y en diciembre odonatos (*Rhionaeschna* y *Cyanallagma*) (Fig. 3). En el humedal 2 de la localidad Río Ñirihuau, *Belostoma bifoveolatum* fue la única especie encontrada en el mes de octubre.

En la Laguna Fantasma las larvas de coleópteros de *Rhantus antarcticus* fueron los depredadores más abundantes durante todos los meses de muestreo (Fig. 4). Las náyades de *Rhionaeschna variegata* fueron poco abundantes y su abundancia mayor fue registrada en el mes de enero. *Notonecta veerertbrughenni* mantuvo una abundancia relativa estable a lo largo de todo el hidropériodo de la laguna. En el humedal Pinar de Festa, la abundancia de larvas de coleópteros del género *Rhantus* fue alta durante todo su hidropériodo; *Belostoma bifoveolatum* el otro depredador hallado en el humedal alcanzó su mayor abundancia relativa en el mes de noviembre (Fig. 5).

Los humedales de la localidad del Ñireco mostraron dos situaciones, los humedales temporarios solo presentaron larvas de *Rhantus* sp. que fueron abundantes a lo largo de todo su corto hidropériodo, mientras que el humedal permanente de esta localidad presentó varias especies de insectos depredadores con abundancias que fluctuaron a lo largo de los meses de muestreo (Fig. 6). Las especies de odonatos (*Cyanallagma*, *Erythrodiplax* y *Rhionaeschna*) fueron muy importantes en este humedal representando más del 40 % de la abundancia relativa de depredadores. Las especies de

*Notonecta* (*N. veerertbrugheni* y *N. virescens*) mantuvieron abundancias relativamente estables durante todos los meses de muestreo (Fig. 6). Las larvas de coleópteros (*Rhantus*, *Lancetes* y *Tropisternus*) junto con el belostomátido *B. bifoveolatum* fueron los depredadores menos abundantes en este humedal (Fig. 6).

Figura 2. Abundancias relativas (%) de insectos depredadores, promedio de los humedales de la localidad del Arroyo Bernal.

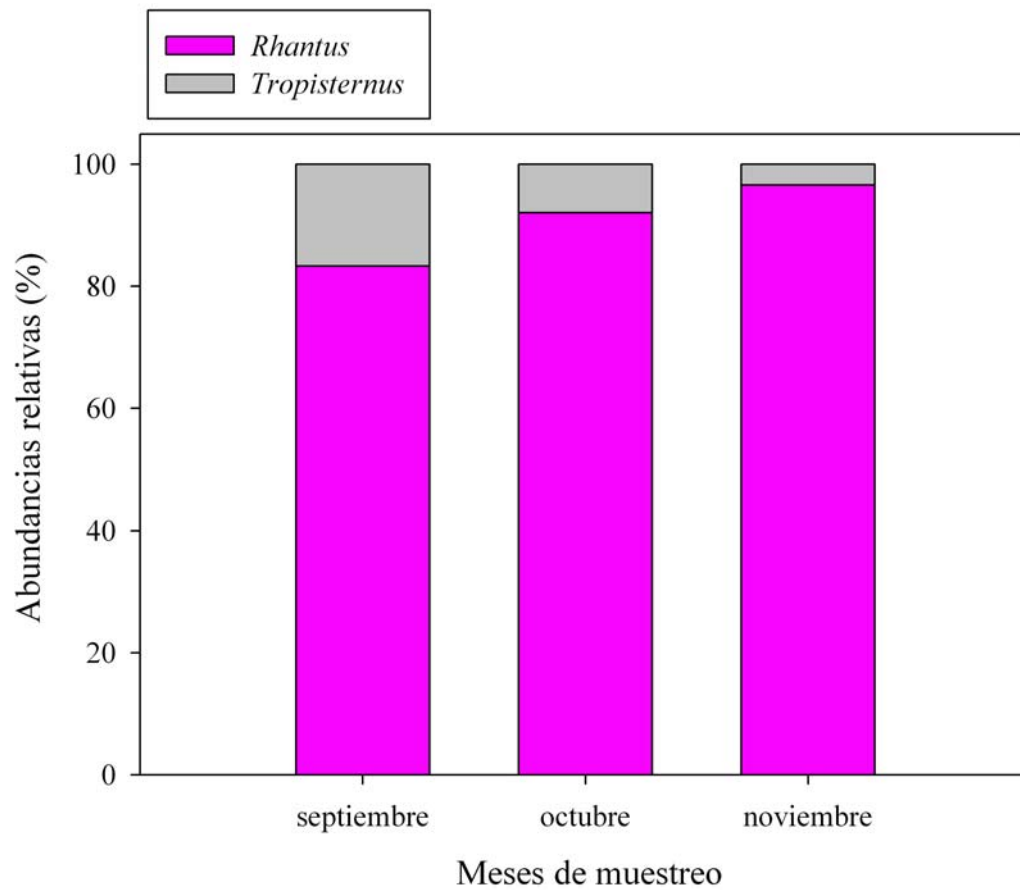


Figura 3. Abundancias relativas (%) de insectos depredadores en los humedales de la localidad del Río Ñirihuau.

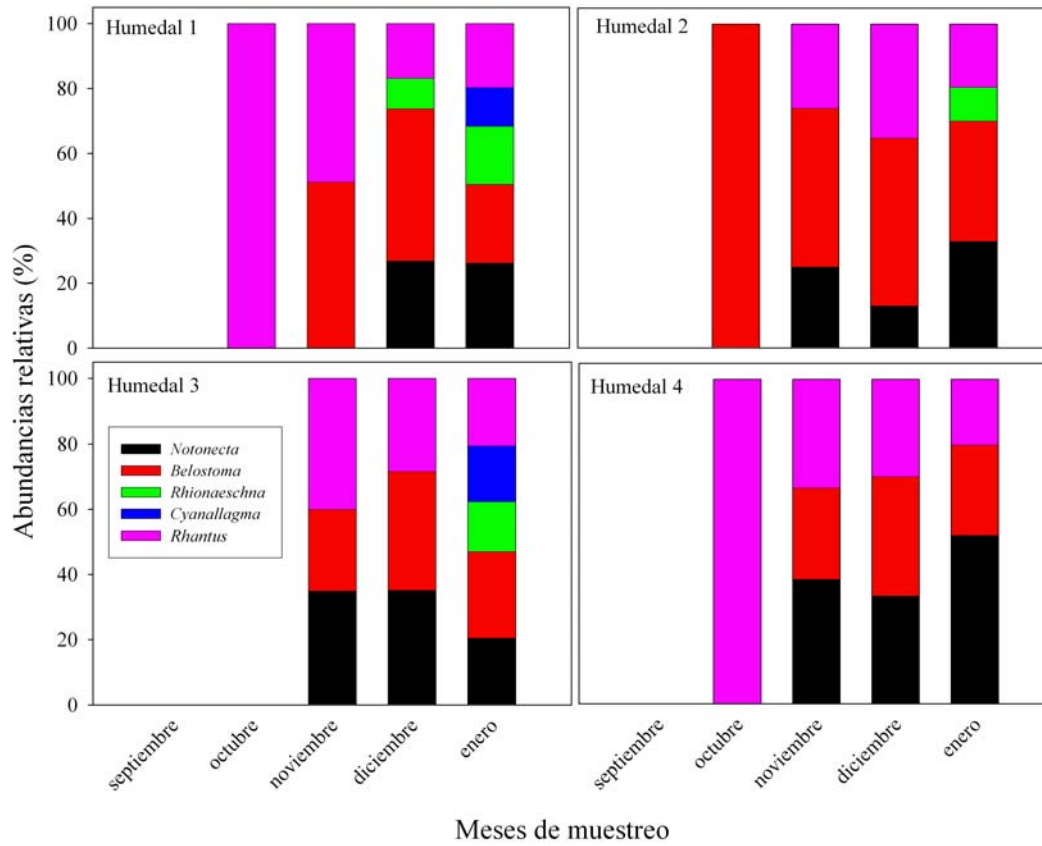


Figura 4. Abundancias relativas (%) de insectos depredadores en la Laguna Fantasma.

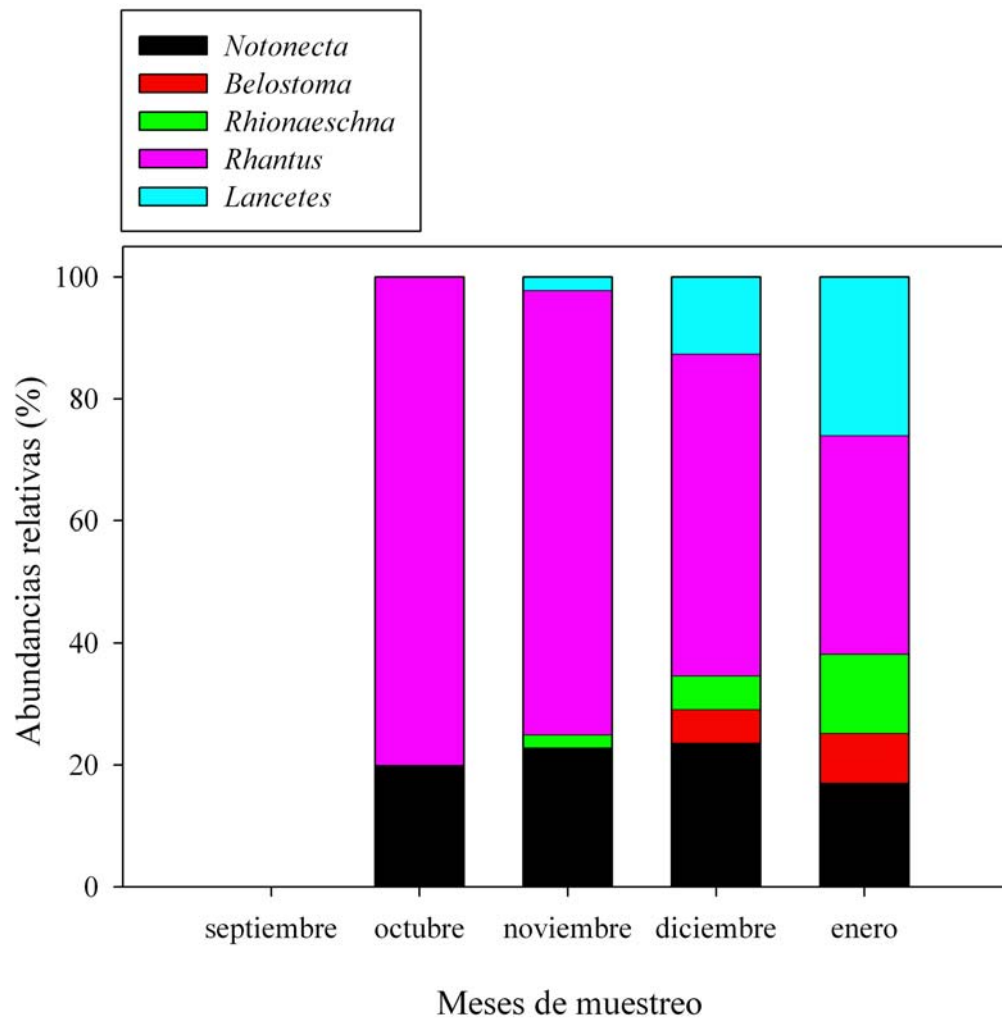


Figura 5. Abundancias relativas (%) de insectos depredadores en el humedal de Pinar de Festa.

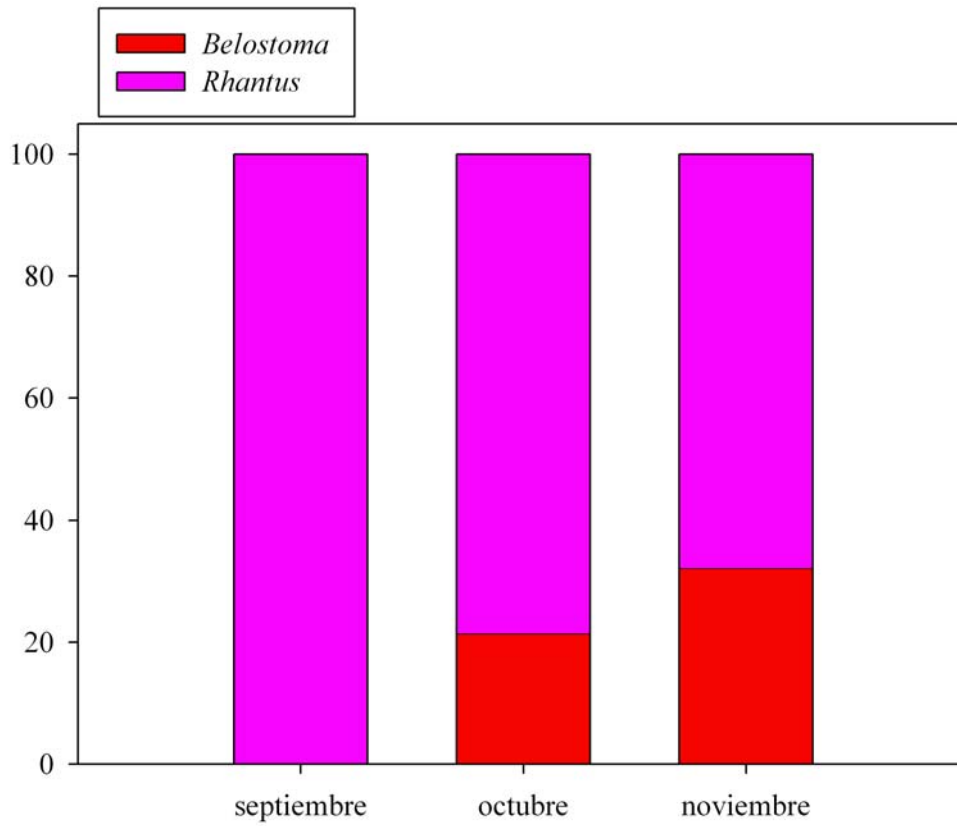
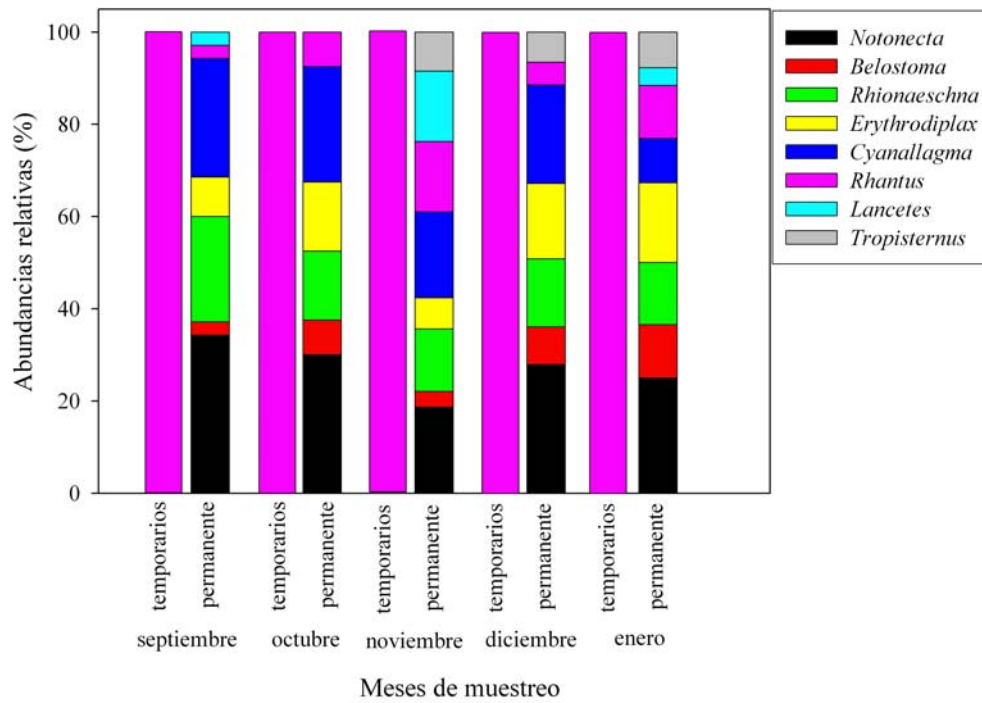


Figura 6. Abundancia relativa (%) de insectos depredadores en un humedal permanente y dos humedales temporarios (promedio) de la localidad del Ñireco.



### Trabajo experimental

La supervivencia de los renacuajos fue afectada por la especie de anuro, el tamaño del renacuajo y el tipo de depredador (Tabla VI, Fig. 7). La presencia de depredadores afectó negativamente la supervivencia de los renacuajos. Se hallaron interacciones significativas entre la especie de anuro y el tamaño del renacuajo, entre la especie de anuro y la especie de depredador, y entre el tamaño del renacuajo y la especie de depredador indicando que los factores no operan independientemente. Además se observó una interacción significativa entre los tres factores evaluados (Tabla VI). La comparación entre las medias de los tratamientos mostró diferencias significativas entre la supervivencia de las especies de anuros. *Pleurodema thaul* y *Rhinella spinulosa* mostraron una mayor supervivencia que *P. bufoninum* al ser expuestos a diferentes depredadores insectos (test *t* de Bonferroni, *P. thaul* vs. *P. bufoninum*  $t = 2,44$ ,  $P < 0,04$ ; *P. bufoninum* vs. *R. spinulosa*,  $t = 3,95$ ,  $P < 0,001$ ). Además se encontraron diferencias significativas entre los tamaños de renacuajos a través de las especies de anuros y las especies de depredadores (supervivencia de renacuajos, media  $\pm$  SE; renacuajos pequeños =  $0,72 \pm 0,03$ ; renacuajos grandes =  $0,79 \pm 0,03$ ) (test *t* de Bonferroni, grandes vs. pequeños  $t = 3,303$ ,  $P = 0,001$ ). El método de comparaciones múltiples también mostró diferencias significativas entre tratamientos de depredadores. La supervivencia de los renacuajos de las diferentes especies fue mayor cuando fueron expuestos a *Notonecta* y *Rhantus* (*Notonecta* vs. *Rhionaeschna*,  $t = 8,08$ ,  $P < 0,001$ ; *Notonecta* vs. *Belostoma*,  $t = 7,19$ ,  $P < 0,001$ ; *Rhantus* vs. *Rhionaeschna*,  $t = 8,90$ ,  $P < 0,001$ ; *Rhantus* vs. *Belostoma*,  $t = 8,00$ ,  $P < 0,001$ , *Notonecta* vs. *Rhantus*,  $t = 0,81$ ,  $P = 1,0$ ; *Belostoma* vs. *Rhionaeschna*,  $t = 0,89$ ,  $P = 1,0$ ). Los renacuajos expuestos a *Belostoma* y *Rhionaeschna* tuvieron tasas de supervivencia bajas. Además se encontró que *Rhantus*, *Notonecta* y *Rhionaeschna* no consumieron renacuajos pequeños de

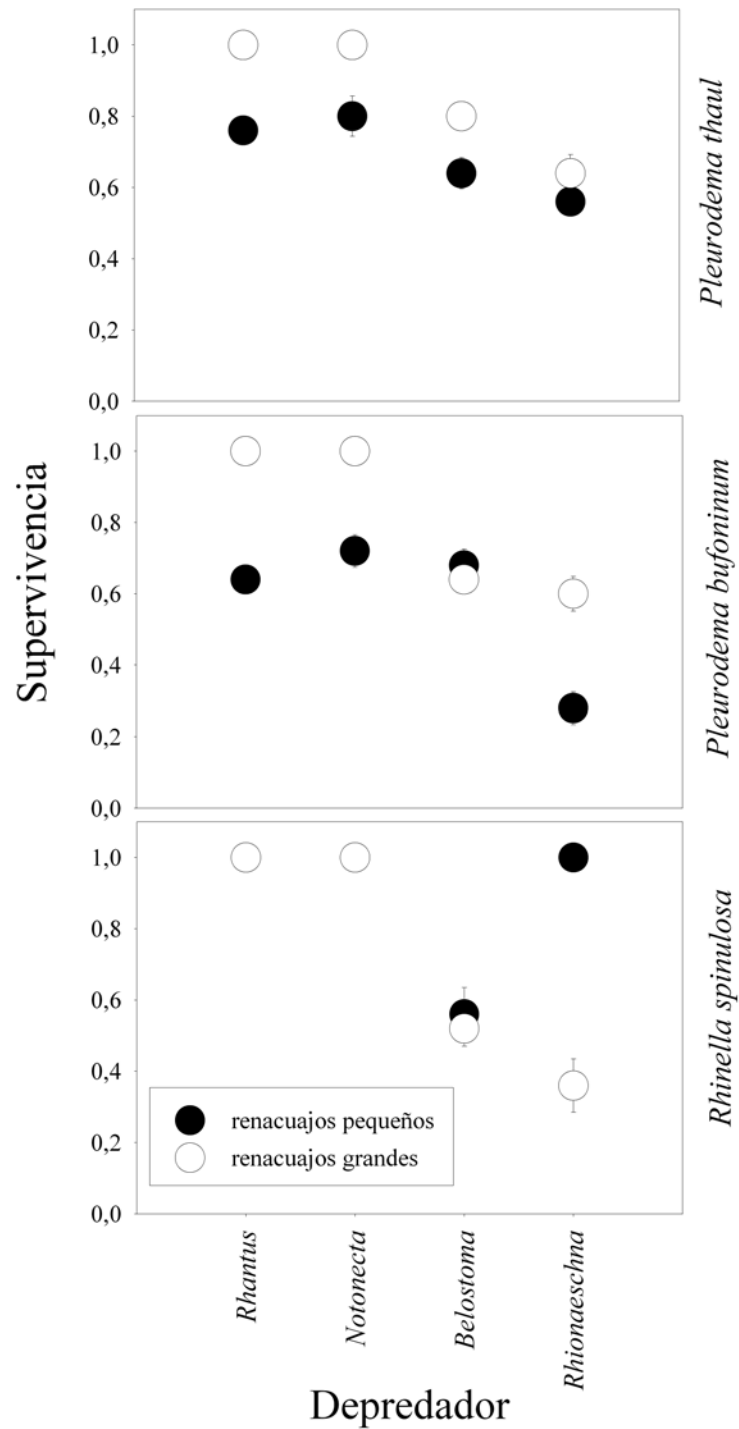


*Rhinella spinulosa* (Fig. 7). Durante los ensayos de supervivencia se observó que el 100% de los renacuajos pequeños de *R. spinulosa* fueron rechazados después de ser capturados por *Rhantus*, *Notonecta* y *Rhionaeschna*. Además en *Rhantus* y *Rhionaeschna* se observó un patrón particular de comportamiento, posterior a la captura y al rechazo de renacuajos de *R. spinulosa*, que consistió en movimientos rápidos de limpieza de las piezas bucales durante varios segundos.

Tabla VI. ANOVA de tres vías para evaluar el efecto de la especie de anuro (SPP), el tamaño del renacuajo (TR) y la especie de depredador (DEPRED) sobre la supervivencia de los renacuajos.

Fuente de Variación	d.f.	MS	F	P
SPP	2	0,409	7,96	<0,001
TR	1	0,560	10,90	0,001
DEPRED	3	2,242	43,66	<0,001
SPP x TR	2	1,110	21,61	<0,001
SPP x DEPRED	6	1,189	3,67	0,002
TR x DEPRED	3	0,370	7,20	<0,001
SPP x TR x DEPRED	6	0,234	4,55	<0,001

Figura 7. Supervivencia de renacuajos (proporción media  $\pm$  SE, N = 5 para cada combinación de tratamientos); Círculos negros = renacuajos pequeños y círculos blancos = renacuajos grandes.



## DISCUSIÓN

Varios autores han establecido que los ambientes de agua dulce temporarios son menos peligrosos para las presas porque carecen de depredadores o bien presentan depredadores de pequeño tamaño (Brendonck *et al.*, 2002). Sin embargo una gran cantidad de evidencia muestra que la depredación por invertebrados acuáticos sobre los anfibios podría ser un factor biótico sumamente importante en la regulación de las comunidades de ambientes temporarios (Sprules, 1972; Lane, 1978; Williams, 1987, 1997; Blaustein, 1990; Blaustein & Dumont, 1990; Graham, 1994; Blaustein *et al.*, 1995; Herwig & Schindler, 1996; Spencer *et al.*, 1999; Wissinger *et al.*, 1999). Nuestros resultados corroboran esta hipótesis ya que en los ambientes temporarios estudiados aquí los insectos acuáticos representan el principal riesgo de depredación para los renacuajos.

Como los depredadores invertebrados más importantes de este tipo de ambientes se han citado a los turbelarios (Blaustein, 1990; Blaustein & Dumont, 1990; Trochine *et al.*, 2008), insectos acuáticos como los notonéctidos (Hemiptera: Notonectidae), larvas de escarabajos acuáticos (Coleoptera: Dytiscidae) y náyades de odonatos (Odonata: Aeshnidae y Libelulidae) (Heyer *et al.*, 1975; Williams, 1987, 1997; Blaustein *et al.*, 1995; Herwig & Schindler, 1996; Spencer *et al.*, 1999; Vonesh, 2003; Jara 2008b; Jara & Perotti, 2009). Los depredadores de mayor tamaño en los ambientes estudiados estuvieron representados por náyades de odonatos, principalmente de *Rhionaeschna variegata* y por el belostomátido, *Belostoma bifoveolatum*. Si bien su abundancia es menor en comparación con la de otros insectos más pequeños, redujeron en mayor medida la supervivencia de los renacuajos en los experimentos de depredación. Como depredadores de menor talla predominantes en los ambientes estudiados, se encontraron

a los notonéctidos (*Notonecta vereertbruggheni* y *N. virescens*), y a las larvas de coleópteros de *Rhantus antarcticus*.

El riesgo de depredación al que estuvieron expuestos los renacuajos de *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* fue variable entre humedales y a lo largo del hidroperíodo. Esto se puede interpretar teniendo en cuenta los procesos de colonización y fenología de los insectos depredadores del área como así también las fluctuaciones en sus abundancias a lo largo de la primavera y el verano. Esto determina diferentes patrones de ensambles de insectos depredadores entre los humedales estudiados.

Los procesos de colonización por insectos y anfibios en ambientes acuáticos temporarios, como así también la estructura de estas comunidades han sido descriptos para una gran variedad de sistemas tropicales y del hemisferio norte (Heyer *et al.*, 1975; Roth & Jackson, 1987; Schneider & Frost, 1996; Wilbur, 1997; Williams, 1997; Azevedo-Ramos *et al.*, 1999; Both *et al.*, 2009). Hasta el momento es muy escasa la información disponible sobre las comunidades de ambientes acuáticos lénticos temporarios de la Patagonia (Perotti *et al.*, 2005; Jara & Perotti, 2009).

En estos ambientes la colonización por insectos acuáticos se extiende a lo largo de la primavera, registrándose la mayor abundancia de insectos entre los meses de noviembre y diciembre. La aparición de las especies de insectos acuáticos sigue un patrón similar que el observado para lagunas artificiales de Estados Unidos empleadas por Roth & Jackson (1987), con coleópteros y notonéctidos como los primeros que arriban al ambiente, para luego finalizar con la colonización por náyades de odonatos. El tamaño del humedal no pareció tener influencia sobre la abundancia y riqueza de depredadores ya que los humedales pequeños fueron colonizados por un máximo de 4 especies de depredadores, resultado que difiere de lo encontrado en otros estudios (Roth

& Jackson, 1987; Urban, 2007). La presencia de vegetación y la profundidad del ambiente podrían ser factores determinantes de la presencia y la abundancia de los depredadores. En este trabajo, los humedales vegetados y más profundos presentaron mayor riqueza específica y abundancia de depredadores, coincidiendo con lo observado en otros estudios donde la duración del hidropériodo afectó la riqueza de especies resultando los cuerpos de agua de mayor duración más ricos en especies de depredadores (Schneider & Frost, 1996; Urban, 2004, 2007). La vegetación brinda refugio para estos depredadores, áreas donde emboscar a sus presas y en algunos casos un sustrato donde adherir sus huevos (Streams, 1982, 1987).

Los procesos de colonización por depredadores en relación con la reproducción y desarrollo larvario de los anuros estudiados podrían tener varias implicancias sobre su ecología. Las primeras cohortes de renacuajos presentes en el ambiente tienen en su etapa de crecimiento una presión por depredación baja, debido a la baja riqueza específica de depredadores al inicio de la primavera. Por lo tanto estos renacuajos pueden invertir la energía en el crecimiento de su masa corporal. De esta manera podrían alcanzar un tamaño lo suficientemente grande para evitar la depredación originada por los primeros insectos que arriban al ambiente. Las cohortes tardías sin embargo encontrarán un escenario diferente. Una posible desventaja en este escenario implica la competencia con renacuajos tardíos que resultarán competidores superiores (Morin, 1987). Aún cuando los renacuajos tardíos abandonen el ambiente acuático, estas cohortes tardías sufrirán depresión en los nutrientes del ambiente tanto por la presión competitiva ejercida por competidores directos como por la disminución de la superficie del humedal con el avance de la temporada (Morin *et al.*, 1990); de esta manera se tornarán menos productivos hacia el final del hidropériodo (Seale, 1980). Finalmente y como ha sido confirmado en este trabajo, los humedales se convierten en hábitats “más

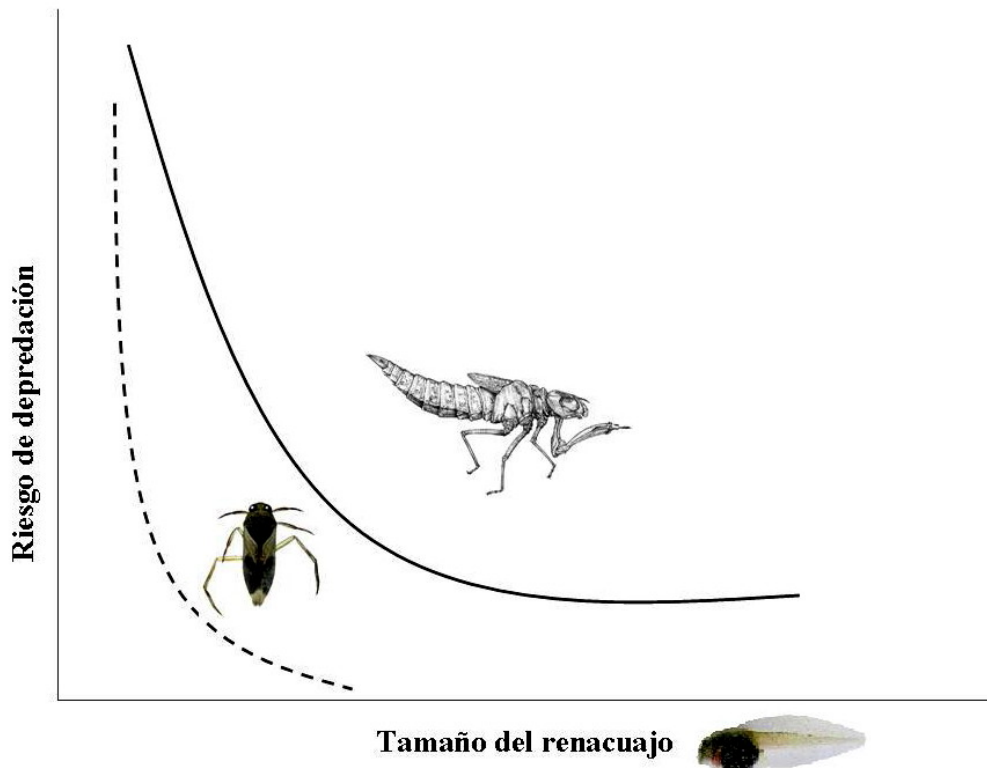
riesgosos” debido al aumento de la variedad y abundancia de insectos depredadores a lo largo del desarrollo de los anuros (Smith, 1983; Roth & Jackson, 1987).

En los experimentos, los depredadores analizados en este estudio tuvieron un impacto diferente sobre la supervivencia de los renacuajos. Los depredadores de menor talla, como notonéctidos y larvas de coleópteros, resultaron menos peligrosos para los renacuajos dado que consumieron solamente renacuajos pequeños de las especies palatables (*Pleurodema*). Estos mismos depredadores encontraron no palatables a los renacuajos pequeños de *Rhinella spinulosa* y no consumieron renacuajos grandes de ninguna de las especies de anuros. Las náyades de *Rhionaeschna variegata* y los adultos de *Belostoma bifoveolatum*, fueron los depredadores que consumieron la mayor cantidad de renacuajos y fueron los únicos capaces de acceder a las presas más grandes. Se ha observado experimentalmente que el tamaño de la presa que un invertebrado puede capturar incrementa con su tamaño (Formanowicz, 1986; Jara, 2008b; Ohba, 2009), y que la preferencia por un determinado tamaño de presa está asociada con el aparato de captura del invertebrado, como las mandíbulas en las larvas de coleópteros, o el primer par de patas raptor en los hemípteros (Formanowicz, 1986). Brodie & Formanowicz (1983) sugirieron que estos depredadores sobrellevan un riesgo de ser dañados cuando se alimentan de presas relativamente grandes y de ser depredados, debido a que los tiempos de manipulación de la presa son más largos y por lo tanto pueden quedar expuestos a otros depredadores, como por ejemplo para el presente estudio podrían ser teros y garzas (presentes en el área de estudio).

El impacto de los insectos depredadores estudiados aquí, mostró ser importante y variable entre especies. Por ejemplo, nuestros resultados confirman que los notonéctidos impactan sobre la supervivencia de los renacuajos solo durante un corto tiempo del periodo larvario resultado que se condice con lo encontrado por otros autores

(Cronin & Travis, 1986; Anderson *et al.*, 2001). En humedales donde varios tamaños de renacuajos coexisten al mismo tiempo (diferentes cohortes, diferentes especies), los depredadores con diferentes estrategias pueden producir diferente riesgo de mortalidad sobre diferentes clases de tamaños de renacuajos y afectar por lo tanto su estructura de tallas (Cronin & Travis, 1986). Para el sistema de depredadores-presas estudiado aquí se podrían hipotetizar curvas de riesgo de depredación en relación con el tamaño del depredador y el tamaño de la presa, cuando estas son palatables (Fig. 8). El riesgo de depredación sería alto para renacuajos pequeños tanto en presencia de depredadores pequeños como grandes, con un decrecimiento rápido a medida que el renacuajo gana masa corporal. A determinada talla de renacuajo el riesgo de depredación es nulo ante la presencia de depredadores pequeños o bien puede mantenerse bajo y constante en presencia de depredadores grandes. El uso del tamaño como estrategia antidepredatoria en renacuajos no es suficiente para evitar la depredación por algunos insectos como las náyades de odonatos. Estos depredadores pueden acceder inclusive a renacuajos de tamaño muy grande (Casanovas & Úbeda, 2006). En este caso los renacuajos podrían desarrollar defensas comportamentales como por ejemplo cambios en los niveles de actividad o cambios a nivel morfológico, para atenuar la depredación por estos depredadores como ha sido observado por otros autores (Skelly & Werner, 1990; Skelly, 1995; Benard, 2004).

Figura 8. Curva hipotética de la relación entre el riesgo de depredación en relación al tamaño del depredador y al tamaño de la presa (presas palatables) para los sistemas estudiados. Línea de puntos = depredadores pequeños, línea completa = depredadores grandes.





En general se ha observado que los huevos, embriones y renacuajos de *Bufo* son menos palatables que los de otros anfibios (Henrickson, 1990; Reading, 1990; Denton & Beebee, 1991; Peterson & Blaustein, 1992). Además, los estudios sobre palatabilidad en diferentes especies del género *Bufo* indican una gran variabilidad en este carácter. Por ejemplo, Brodie & Formanowicz (1987) encontraron que los estadios post-eclosión de *Bufo americanus* no son palatables para depredadores vertebrados e invertebrados. Por otro lado, Lawler & Hero (1997) observaron que la palatabilidad de *Bufo marinus* decrece a lo largo de la ontogenia frente a un depredador pez. También, se ha observado que *Rhinella arenarum* puede resultar palatable a lo largo de toda la ontogenia para algunos depredadores insectos como los belostomátidos (Kehr & Schnack, 1991). De acuerdo a nuestros resultados los renacuajos de *Rhinella spinulosa* no son palatables para el depredador *Rhionaeschna variegata* en estadios tempranos del desarrollo, coincidiendo con Jara & Perotti (2006, 2009). Además se observó que larvas del coleóptero *Rhantus antarcticus* y adultos de *Notonecta vereertbruggheni* rechazaron los renacuajos pequeños de *R. spinulosa* luego de capturarlos. Muchos trabajos han demostrado cómo invertebrados que poseen aparatos bucales suctopíedadores (heterópteros) se ven menos afectados por las toxinas de diferentes especies de anuros que aquellos invertebrados que poseen aparatos bucales masticadores (odonatos y algunos coleópteros). Nuestros resultados muestran que esto no es una regla general, dado que *N. vereertbruggheni* posee un aparato suctopíedador y sin embargo su comportamiento durante los experimentos de depredación reveló que los renacuajos pequeños de *R. spinulosa* le resultaron no palatables.

Muchas especies de anfibios que son no palatables durante algunos estadios larvarios también son gregarias (Brodie & Formanowicz, 1987). Se ha observado que la experiencia previa de los depredadores con estadios no palatables reduce la mortalidad

en estadios palatables. La formación de agregaciones mixtas de larvas en estadios palatables y no palatables en estas especies como es el caso de *R. spinulosa* (Jara *et al.*, 2006) sería sumamente beneficioso para los estadios palatables. Los resultados de estos autores apoyan la hipótesis de que el comportamiento gregario habría surgido como resultado de la presencia de toxinas en diferentes estadios del desarrollo de los renacuajos (Waldman & Adler, 1979).

En los ambientes patagónicos que habita *R. spinulosa* existen otros depredadores como arañas semiacuáticas como así también aves y otros vertebrados (Jara & Perotti, 2004), para los cuales se desconoce si la presencia de sustancias tóxicas en estos renacuajos serían efectivas.

## CAPÍTULO IV

MODIFICACIONES EN LA ACTIVIDAD DE RENACUAJOS DE *PLEURODEMA* Y  
*RHINELLA* EN RESPUESTA A LA PRESENCIA DE INSECTOS DEPREDAADORES

## INTRODUCCIÓN

Muchos organismos tales como larvas de anfibios, modifican su conducta en presencia de sus depredadores. La conducta es uno de los rasgos más plásticos citados en la literatura (*e.g.* Smith & Van Buskirk, 1995; Laurila *et al.*, 1998; Skelly, 1997; Benard, 2004; McIntyre *et al.*, 2004; Mikolajewski & Johansson, 2004; Sharma *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la presencia indirecta de depredadores induce diferentes comportamientos en los renacuajos: 1) aumento o disminución de la actividad (Hews & Blaustein, 1985; Hews, 1988; Kiesecker *et al.*, 1996; Richardson, 2001; Sharma *et al.*, 2008; Jara & Perotti, 2009), 2) incremento en el uso de refugios (Stauffer & Semlitsch, 1993; Kiesecker *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 2002), 3) aumento de la cohesión del grupo en especies que forman cardúmenes (Watt *et al.*, 1997; Spieler & Linsenmair, 1999; Spieler, 2003) y 4) evitación de las áreas con depredadores (Petranka *et al.*, 1987; Peterson *et al.*, 1992; Laurila *et al.*, 1998), entre otros. Estas modificaciones de la conducta se evidencian solo en presencia de los depredadores (Miner *et al.*, 2005) y además pueden estar condicionadas por varios factores como palatabilidad, tamaño del renacuajo, coevolución del depredador y la presa, entre otros (Eklöv & Werner, 2000; Mathis *et al.*, 2003; Relyea, 2003; Heiling & Herberstein, 2004; Kishida *et al.*, 2006; Richter-Boix *et al.*, 2008). Para muchas especies la plasticidad fenotípica parece funcionar como un mecanismo frente al riesgo de depredación, que puede variar espacialmente y/o temporalmente. Algunas especies han desarrollado respuestas específicas a cada depredador y por otro lado no todas las especies responden a la

presencia de depredadores a lo largo del desarrollo larvario (Relyea, 2001b; Schmidt & Amézquita, 2001; Van Buskirk, 2001; Jara & Perotti, 2009).

Se ha observado que las respuestas conductuales en renacuajos frente a los depredadores están influenciadas por el tamaño o edad del renacuajo, palatabilidad y en algunos casos la experiencia previa con el depredador (Schmidt & Amézquita, 2001; Mathis *et al.*, 2003; Relyea, 2003). Se ha visto que el comportamiento de los renacuajos frente a sus depredadores manifiesta ciertos cambios a lo largo de su ontogenia. En particular se observa que los renacuajos más pequeños reducen su actividad frente a sus depredadores pero los renacuajos más grandes ya no presentan dicha respuesta (Mathis *et al.*, 2003).

Varios trabajos han estudiado las formas en que los renacuajos detectan a sus potenciales depredadores (Kats *et al.*, 1988; Stauffer & Semlitsch, 1993; Kiesecker *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2008; Takahara *et al.*, 2008 a y b). Se ha observado que las señales químicas liberadas por los depredadores juegan un rol central en los comportamientos antidepredatorios de las larvas de anfibios (Petranka *et al.*, 1987; Stauffer & Semlitsch, 1993). Dentro de estas señales varios autores reconocen a las kairomonas y metabolitos producto de la digestión de las presas (Chivers & Smith, 1998; Kats & Dill, 1998; Brönmark & Hansson, 2000; Schoepner & Relyea, 2005). Wisenden (2000) clasificó las señales químicas empleadas por las presas para percibir a sus potenciales depredadores en: a) kairomonas del depredador y feromonas de disturbio liberadas por coespecíficos que actúan previo al ataque, b) sustancias de alarma liberadas por conspecíficos dañados durante el ataque y c) señales químicas liberadas por los depredadores durante la ingestión y digestión de presas. Algunos de estos compuestos parecen ser muy solubles en el agua y poco volátiles, razones por las cuales pueden ser percibidas por las presas aún cuando haya transcurrido un tiempo

prolongado desde el momento en que estos compuestos fueron liberados al agua (Takahara *et al.*, 2008 a).

La actividad de los renacuajos está directamente relacionada con el riesgo de depredación, cuando estos habitan ambientes con depredadores que emplean la visión y el tacto para capturar a sus presas, como por ejemplo los peces y los insectos acuáticos (Skelly, 1997; Sharma *et al.*, 2008). A mayores niveles de actividad, mayor es el riesgo a ser depredados, resultando ser más detectables por estos depredadores. Skelly (1997) demostró que los renacuajos que presentan un nivel más bajo de actividad aumentan significativamente su supervivencia cuando están expuestos a náyades de odonatos. Por otro lado, otros autores han descrito que niveles más bajos de actividad reducirían las tasas de crecimiento, exponiendo durante mayor tiempo al renacuajo al riesgo de depredación, y en algunas circunstancias (en ambientes temporarios) aumentando del riesgo de mortalidad por desecación antes de culminar la metamorfosis (Skelly, 1996). Todo organismo debe obtener recursos para poder crecer, pero al mismo tiempo la obtención de recursos mediante las actividades de forrajeo lo expone a un mayor riesgo de depredación. Es de esperar que una presa reduzca sus niveles de actividad cuando esté expuesta a un riesgo de depredación mayor (Benard, 2004), sobre todo cuando la presa puede compensar la reducción de la adquisición de recursos forrajeando más cuando el riesgo de depredación disminuya en el ambiente (Lima & Bednekoff, 1999; Urban, 2007).

El objetivo de este capítulo es estudiar si los renacuajos de *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* modifican sus niveles de actividad en relación con su tamaño y palatabilidad, frente a la presencia de los insectos depredadores más comunes en los humedales estudiados.

Las hipótesis y las predicciones correspondientes fueron:

Hipótesis 1: los renacuajos de *Pleurodema* y *Rhinella* responden a la presencia de depredadores modificando su actividad.

Predicción: los renacuajos expuestos a sus depredadores mostrarán una reducción en la actividad.

Hipótesis 2: la respuesta en la actividad de los renacuajos de las tres especies dependerá de su tamaño.

Predicción: los renacuajos más pequeños reducirán en mayor medida la actividad que aquellos renacuajos de mayor tamaño.

Hipótesis 3: la palatabilidad de los renacuajos influencia su respuesta a los depredadores.

Predicción: renacuajos de especies poco palatables (*Rhinella spinulosa*) no modificarán su actividad en presencia de depredadores.

## METODOLOGÍA

### **Preparación y monitoreo del experimento**

Se colectaron 4 oviposturas de cada especie provenientes de la Laguna Fantasma en el caso de *Pleurodema thaul* y del humedal 1 de la localidad del Ñireco para *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*. Todas las oviposturas se mantuvieron en un cuarto bajo condiciones de fotoperíodo y temperatura controlados hasta la eclosión (12:12 L-O;  $18 \pm 1$  °C). La luz del cuarto fue proporcionada por 4 lámparas fluorescentes Philips daylight TLT 40W/54RS. Después de la eclosión, las larvas de diferentes oviposturas fueron puleadas y mantenidas en un predio externo al laboratorio de Fotobiología (INIBIOMA-CRUB, CONICET) en contenedores con agua de arroyo y alimentados con

un cultivo de algas y alimento para peces hasta alcanzar el estadio de desarrollo deseado para iniciar los experimentos.

Los insectos depredadores empleados en los experimentos fueron colectados con redes de mano en las localidades de Arroyo Ñireco y Laguna Fantasma, y correspondieron a las especies: *Rhantus antarcticus*, *Notonecta vereertbruggheni*, *Belostoma bifoveolatum* y *Rhionaeschna variegata*. Los depredadores fueron alimentados diariamente durante una semana con larvas de mosquitos y/o zooplancton hasta 24 horas antes de iniciar los experimentos. El tamaño de los depredadores fue: *Notonecta* 12,24 mm  $\pm$  0,62 mm (media  $\pm$  SD), *Rhantus* 25,21 mm  $\pm$  1,76 mm, *Belostoma* 25,73 mm  $\pm$  1,04 mm, y *Rhionaeschna* 34,93 mm  $\pm$  1,77 mm.

El experimento consistió en un diseño factorial de tres vías, cuyos factores fueron: la especie de anuro (*Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*), el tamaño del renacuajo (pequeños y grandes) y la especie de depredador (control, *Rhantus*, *Notonecta*, *Belostoma* y *Rhionaeschna*). Cada combinación de tratamientos fue replicada 10 veces (300 réplicas en total).

Las unidades experimentales fueron recipientes de plástico opaco de 24 x 12 x 5 cm con 1 litro de agua natural sin clorar. Cada bandeja contenía una jaula para el depredador y un renacuajo (Fig. 1).

Figura 1. Recinto experimental para medir la actividad de los renacuajos.



La jaula del depredador era cilíndrica (5 cm diámetro x 10 cm longitud) y de malla de plástico de 2 mm de poro. De esta manera se impidió que el depredador capture al renacuajo, y al mismo tiempo se permitió que el renacuajo percibiera la difusión de posibles señales químicas del depredador como así también la detección visual y táctil. La jaula conteniendo un ejemplar del depredador *Rhionaeschna* y *Belostoma* o dos ejemplares en el caso de los depredadores más pequeños (*Notonecta* y *Rhantus*), se ubicó en uno de los extremos de la bandeja. Los controles donde se midió la actividad normal de las especies, consistieron en contenedores similares donde se colocó una jaula vacía. Antes de iniciar el registro de datos, los renacuajos y los depredadores fueron aclimatados por 30 min en las bandejas experimentales. Luego de la aclimatación se midió la actividad del renacuajo empleando el método de “scan-sampling” (Martin & Bateson, 1993). Para cada renacuajo la actividad se registró cada 20 seg en un periodo de dos minutos, totalizando seis observaciones para cada réplica. Un renacuajo se determinó como activo, cuando se encontraba nadando o cuando estaba



estacionario pero con movimientos de la cola. Los datos de actividad fueron expresados como una proporción (número de veces observado activo/total de observaciones).

*Análisis estadísticos.* La actividad de los renacuajos fue analizada mediante un ANOVA de tres vías cuyos factores fueron: especie de anuro, tamaño del renacuajo y especie de depredador. Los análisis a *posteriori* para determinar cuales de los tratamientos fueron diferentes entre sí, se realizaron mediante el test de Bonferroni.

## RESULTADOS

La actividad de los renacuajos estuvo afectada por la especie de anuro, el tamaño del renacuajo y la especie de depredador (Tabla I, Fig. 2). Se observó interacción solo entre el tamaño del renacuajo y la especie de depredador, y entre la especie de anuro y el tamaño del renacuajo. Sin embargo no hubo interacción entre la especie de anuro y la especie de depredador. Tampoco se observó efecto significativo de la triple interacción.

Tabla I. ANOVA de tres factores para analizar el efecto de la especie de anuro (SPP), tamaño del renacuajo (TR) y especie de depredador (DEPRED) sobre la actividad de renacuajos.

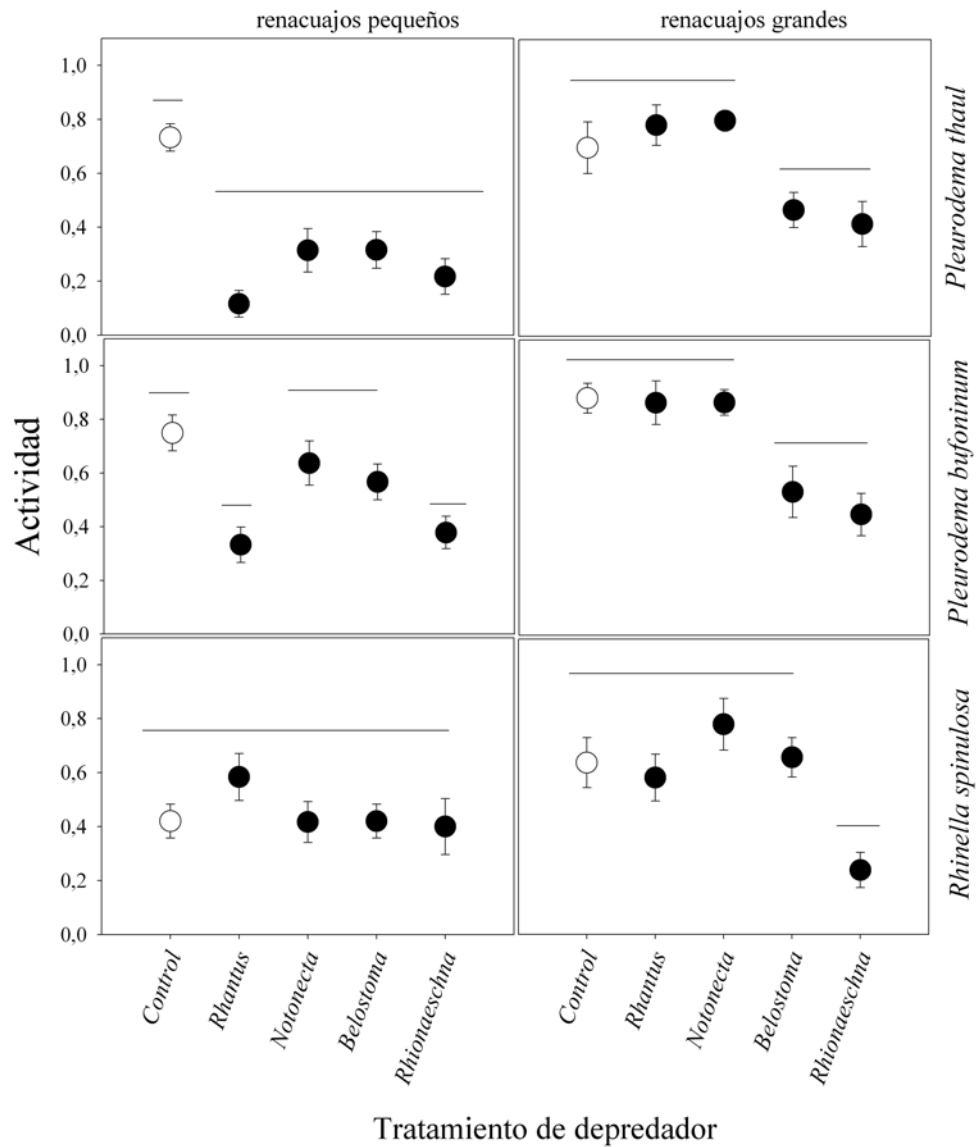
Fuente de variación	d. f.	<i>F</i>	<i>P</i>
SPP	2,00	10,94	<0,001
TR	1,00	55,09	<0,001
DEPRED	4,00	16,99	<0,001
SPP x TR	2,00	3,08	0,05
SPP x DEPRED	8,00	1,89	0,06
TR x DEPRED	4,00	7,86	<0,001
SPP x TR x DEPRED	8,00	3,48	<0,001

El test de Bonferroni mostró diferencias significativas en la actividad entre ambas especies de *Pleurodema* (*P. thaul* vs. *P. bufoninum*,  $t = 3,85$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 2). Al comparar el tamaño del renacuajo a través de los niveles de la especie y del depredador observamos que los renacuajos grandes son más activos que los renacuajos pequeños (promedio de actividad renacuajos pequeños = 0,704, SE = 0,031; promedio de actividad renacuajos grandes = 0,989, SE = 0,0351) (pequeños vs. grandes,  $t = 8,157$ ,  $P < 0,001$ ) (Fig. 2). Se observaron diferencias en la actividad en cada nivel del depredador a través de los niveles de especie de anuro y tamaño de renacuajo. Se observaron diferencias significativas entre especies de anuros cuando fueron expuestas a *Rhantus* y *Notonecta* (*Rhantus-R. spinulosa* vs. *Rhantus-P. bufoninum*,  $t = 3,17$ ,  $P =$

0,005; *Rhantus-P. bufoninum* vs *Rhantus-P. thaul*,  $t = 3,17$ ,  $P = 0,005$ ) (*Notonecta-R. spinulosa* vs. *Notonecta-P. thaul*,  $t = 4,36$ ,  $P < 0,001$ ) (Fig. 2).

Los renacuajos pequeños de *P. bufoninum* y *P. thaul* resultaron significativamente menos activos que los renacuajos grandes al ser expuestos a los depredadores *Rhantus* y *Notonecta* (*Rhantus*: renacuajos pequeños vs. grandes  $t = 4,14$ ,  $P < 0,001$ ; *Notonecta*: renacuajos pequeños vs. grandes  $t = 8,40$ ,  $P < 0,001$ ) (Fig. 2).

Figura 2. Actividad de renacuajos pequeños y grandes (proporción, media  $\pm$  ES, N=10 para cada combinación de tratamientos) de las tres especies de anuros expuestas a 4 depredadores y un control (sin depredador). Las líneas sobre las medias indican grupos homogéneos (test de Bonferroni).



## DISCUSIÓN

Las respuestas comportamentales de las presas frente a sus depredadores puede alterar en gran medida la dinámica de las comunidades. La reducción de la actividad en larvas de anuros es un patrón de respuesta generalizado cuando están expuestas a la depredación. En este estudio los renacuajos de *Pleurodema* y *Rhinella* modificaron sus niveles de actividad en respuesta a determinados depredadores. Estas respuestas del comportamiento están generalmente asociadas con el riesgo de depredación impuesto por cada depredador, como ha sido observado en otros trabajos (Relyea, 2003). Además en este estudio se demostró que la palatabilidad de los renacuajos está relacionada con las respuestas conductuales de estos, como lo demuestran los resultados obtenidos para la especie menos palatable (*Rhinella spinulosa*), cuyos renacuajos no expresaron respuesta en la actividad frente a la presencia de los depredadores. Sin embargo la actividad normal para esta especie (*i.e* tratamiento control) fue mucho menor respecto de las especies del género *Pleurodema* (ver Fig. 2)

*Cambios en los niveles de actividad en relación al tamaño del renacuajo*

Los renacuajos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* (palatables a lo largo de toda su ontogenia) respondieron a sus depredadores modificando sus niveles de actividad. Tales respuestas estuvieron asociadas con su tamaño, siendo los renacuajos más pequeños susceptibles a todos los depredadores testeados aquí, y resultando significativamente menos activos cuando fueron expuestos a estos. Observaciones similares fueron hechas por otros autores (*e.g.* Sih & Kats, 1994; Eklöv & Werner, 2000), cuyos resultados indicaron que existirían ajustes del comportamiento a lo largo de la ontogenia del renacuajo, por lo que futuros estudios sobre respuestas

comportamentales deberían tener en cuenta esta variable. Relyea (2003) propone que además los renacuajos podrían cambiar sus defensas plásticas a lo largo de su ontogenia. En estadios tempranos e intermedios los renacuajos cambiarían su actividad o el uso de refugios frente a un depredador, pero en estadios tardíos solamente alterarían su morfología.

Si bien los renacuajos pequeños de *P. thaul* y *P. bufoninum* respondieron a la mayoría de los depredadores a los que fueron expuestos, los renacuajos grandes de estas especies solo respondieron a los depredadores de mayor tamaño (*Belostoma* y *Rhionaeschna*). Nosotros interpretamos que los renacuajos grandes de *Pleurodema* no modifican su actividad frente a la presencia de depredadores pequeños como *Rhantus* y *Notonecta* por que estos depredadores no representan un riesgo de depredación (Capítulo III). Por lo tanto el tamaño del renacuajo constituye una protección contra la depredación por depredadores pequeños y los cambios del comportamiento serían una respuesta adaptativa solo en etapas tempranas de la ontogenia. Entonces, la presencia de depredadores pequeños podría favorecer el crecimiento rápido de los renacuajos hasta alcanzar un tamaño al cual sean invulnerables a la depredación (Travis *et al.*, 1985; Kiesecker *et al.*, 1996; Anderson, 2001). La presencia de depredadores que seleccionan a sus presas por el tamaño, como los insectos estudiados aquí, podrían favorecer el desarrollo de respuestas conductuales en diferentes etapas del desarrollo de los renacuajos. El tamaño de los depredadores, como así también el aparato de captura que emplean para atrapar a sus presas, determinan en gran medida el espectro de tamaños de presas al cual pueden acceder (Cronin & Travis, 1986; Allan *et al.*, 1987; Richard & Bull, 1990; Jara, 2008 a y b). Por esta razón, la presencia de determinados depredadores podría inducir modificaciones del comportamiento solo en aquellos tamaños de renacuajos que pueden ser depredados. Cuando la mortalidad debido a la depredación es

dependiente del tamaño de la presa, los modelos teóricos predicen que las conductas antidepredatorias se modifican con el crecimiento (Werner & Anholt, 1993). Por lo tanto sería de esperar que los renacuajos respondan independientemente de su tamaño, solo a aquellos depredadores que impliquen un riesgo de depredación para cualquier tamaño, como fue observado por otros autores (Laurila *et al.*, 1998). Esto condice con lo observado en este trabajo donde renacuajos grandes de *Pleurodema* solo respondieron a aquellos depredadores que implicaron un riesgo de mortalidad para ellos (*Belostoma bifoveolatum* y *Rhionaeschna variegata*).

#### *Palatabilidad y plasticidad del comportamiento*

Los renacuajos pequeños de *Rhinella spinulosa* mostraron ser poco palatables para la mayoría de los depredadores testeados aquí (Capítulo III). *Belostoma bifoveolatum* fue el único depredador que consumió estos renacuajos, sugiriendo que este tipo de defensa no es efectiva contra este depredador. Sin embargo, aunque este belostomátido resultó ser un peligroso y potencial depredador de *R. spinulosa*, no se observó que estos renacuajos redujeran la actividad cuando fueron expuestos a éste. Estudios previos también han observado que los renacuajos de ciertas especies no responden a todos sus potenciales depredadores (Kats *et al.*, 1988; Sih, 1992; Schmidt & Amezcuita, 2001). Al respecto, se ha observado que las respuestas comportamentales como la actividad en este caso, están influenciadas por diferentes factores como el hambreado (*e.g.* Anholt & Werner 1995), la experiencia y el aprendizaje (*e.g.* Sih & Kats, 1994), la dieta del depredador y su forma de alimentación (*e.g.* Laurila *et al.*, 1998), y la disponibilidad de señales para detectar al depredador (*e.g.* Stauffer & Semlitsch, 1993). Sin embargo estas variables no muestran ser las responsables de las diferentes respuestas observadas en este trabajo. Los experimentos fueron conducidos

bajo las mismas condiciones y todos los renacuajos provinieron de poblaciones en donde renacuajos y depredadores generalmente coexisten. Por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo podrían sustentar la hipótesis establecida por Schmidt & Amézquita (2001). Estos autores propusieron que renacuajos de *Phyllomedusa tarsius* no responde a los belostomátidos por que en general esta presa y este depredador no habitan los mismos ambientes. De la misma forma, los renacuajos de *Ascaphus truei* y *Alytes muletensis* responden únicamente a aquellos depredadores con los cuales coexisten frecuentemente pero no responden ante la presencia de depredadores poco comunes en sus hábitats (Feminilla & Hawkins, 1994; Griffiths *et al.*, 1998). En nuestro sistema *B. bifoveolatum* es un depredador poco frecuente en los ambientes donde los renacuajos de *Rhinella spinulosa* viven (Jara & Perotti, 2009). Además se observó en condiciones naturales que los renacuajos de este sapo se agregan en las partes someras de las lagunas con poca o ninguna vegetación (Jara *et al.*, 2006). *Belostoma bifoveolatum*, al igual que otros belostomátidos, está fuertemente asociada a la vegetación acuática, como macrófitas flotantes y sumergidas que son usadas como soporte y sitio para emboscar a sus presas (Babbitt & Jordan, 1996; Swart & Taylor, 2004; Reyes & Estévez, 2005). Por lo tanto, si bien en nuestro estudio observamos un humedal donde los renacuajos de *R. spinulosa* coexiste con *Belostoma*, esto ocurre en pocas ocasiones. El relevamiento de más poblaciones de *R. spinulosa* y sus depredadores presentes, sería necesario para confirmar esta hipótesis.

Las náyades del odonato *Rhionaeschna variegata* ocurren más frecuentemente que *Belostoma* en los humedales aquí estudiados y los resultados obtenidos muestran que *R. spinulosa* responde a la presencia de este depredador. Específicamente, los renacuajos grandes de *Rhinella spinulosa* redujeron su actividad en presencia de este depredador. En otros trabajos se ha observado que los renacuajos de varios bufónidos



responden comportamentalmente a la presencia de estos depredadores que son tan comunes en los ambientes colonizados por anfibios (Skelly & Werner, 1990; Semlitsch & Gavasso, 1992; Anholt *et al.*, 1996; Perotti *et al.*, 2006; Stav *et al.*, 2007). Además hemos observado que los cambios en la palatabilidad de *Rhinella spinulosa* a lo largo de la ontogenia requiere de estrategias alternativas de defensa contra este depredador, como son las defensas inducidas observadas en este trabajo. Es fácil interpretar que estas defensas específicas no podrían haberse desarrollado si *Rhinella spinulosa* coexistiera en pocas ocasiones con *Rhionaeschna variegata*. Nosotros sugerimos que los renacuajos de *R. spinulosa* emplean tanto defensas constitutivas (químicas) como inducidas que se alternan a lo largo de la ontogenia. Karban & Baldwin (1997) expusieron que ambos tipos de defensas constituyen modos alternativos de protección tanto en plantas como en animales. Estudios más recientes en otras especies de anuros también han sugerido la existencia de estrategias de defensa mixtas que involucran tanto un componente constitutivo como inducido (Álvarez & Nicieza, 2006).

#### *Detección de los depredadores*

Durante el desarrollo de los experimentos, los renacuajos podrían percibir señales químicas del depredador como así también visuales y aquellas derivadas del movimiento de los depredadores dentro de sus jaulas. En primer lugar la malla de poro pequeño es posible que haya reducido el posible avistamiento del depredador dentro de la jaula. Los depredadores empleados aquí, en general son poco móviles y su movilidad se ve aún más reducida dentro de las jaulas que los contenían. Por lo tanto podríamos decir que la principal fuente de reconocimiento del depredador haya sido de tipo químico, como ha sido observado para otras especies de renacuajos (Kats *et al.*, 1988; Stauffer & Semlitsch, 1993; Kiesecker *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2008; Takahara *et al.*,

2008a). Dentro de las señales químicas se podrían descartar aquellas provenientes de la digestión de congéneres ya que los depredadores fueron alimentados únicamente con zooplancton y larvas de mosquitos. Por lo tanto, los renacuajos estarían detectando principalmente las caïromonas o los “olores” de los depredadores. El uso de las señales químicas liberadas por depredadores parece dar información crucial al renacuajo sobre la presencia de un depredador, sobre todo en horas nocturnas, o en ambientes de aguas turbias y muy vegetados donde la complejidad estructural impide el uso de la visión. Además la detección química sería esencial cuando los renacuajos se encuentran frente a un depredador de coloración críptica y que caza al acecho (Kiesecker *et al.*, 1996), características que presentan todos los depredadores utilizados en este estudio.

#### *Respuestas conductuales en renacuajos de Pleurodema y Rhinella*

En este trabajo se reporta por primera vez la existencia de respuestas comportamentales frente a depredadores en renacuajos de la familia Leiuperidae (recientemente separada de la gran familia Leptodactylidae (Grant *et al.*, 2006). Los renacuajos de *Pleurodema* estudiados aquí parecen ser bastante sensibles a la presencia de depredadores insectos, similarmente a lo encontrado en renacuajos de hílidos y ránidos. Los renacuajos de *Rhinella spinulosa* mostraron ser menos sensibles a la presencia de los depredadores, de manera similar a lo hallado en otras especies de la familia Bufonidae (Van Buskirk, 2002). Estos resultados podrían relacionarse con el hecho de que en este grupo de especies se emplean estrategias de defensa alternativas (Richardson, 2001), como la formación de agregaciones (“schools”) ó la producción de sustancias de alarma y la presencia de toxinas (Wassersug, 1973; Arnold & Wassersug, 1978; Beiswenger, 1975, 1977, 1981; Formanowicz & Brodie, 1982; Hews & Blaustein, 1985; Esterovick & Sazima, 1999).

---

*La actividad de renacuajos en relación con sus hábitats*

Skelly (1997) estableció que los renacuajos de especies que habitan lagunas permanentes son menos activos que aquellos renacuajos de ambientes temporarios. Por otro lado, se ha observado que las especies de renacuajos más activas resultan ser competidores superiores sobre aquellas especies que son menos activas (Skelly, 1997). Sin embargo, la mayor actividad incrementa el riesgo a la depredación. Por lo tanto, respuestas relacionadas al comportamiento (actividad) podrían resultar estrategias importantes para evitar la depredación en estos renacuajos con mayores tasas de actividad en ambientes variables respecto al riesgo de depredación. Se requieren más estudios en especies de la familia Leiuperidae para analizar y comparar si los patrones del comportamiento son adaptativos o resultan aspectos comunes y relacionados a su historia filogenética.

Las respuestas en la actividad observadas en las tres especies de anuros muestran estar asociadas con varios factores como la edad del renacuajo, la palatabilidad y el tipo de depredador. Durante el desarrollo larvario los anuros estudiados aquí son depredados por diferentes insectos acuáticos. En etapas tempranas del desarrollo (renacuajos pequeños) las larvas de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* son altamente vulnerables a todos sus depredadores, y la presencia de estos reduce en gran medida la actividad de las larvas. Sin embargo al alcanzar un tamaño mayor, las larvas se hacen menos sensibles a los depredadores, reduciendo la actividad solamente frente a la presencia de los depredadores de mayor tamaño (belostomátidos y náyades de odonatos). La inpalatabilidad de renacuajos pequeños de *Rhinella spinulosa*, los protege contra la depredación de tres de los depredadores estudiados (*Notonecta*, *Rhantus* y *Rhionaeschna*). Además esta defensa química parece influenciar la respuesta del comportamiento en esta especie. Por otro lado la ausencia de respuesta comportamental

frente a determinados depredadores (*Belostoma bifoveolatum*) podría estar asociada al encuentro poco frecuente en la naturaleza entre esta presa y este depredador. Por todo esto, los patrones en las respuestas comportamentales (cambios en la actividad) observadas en las tres especies de anuros estarían relacionadas directamente con la interacción con diferentes depredadores que experimentan en sus hábitats. Las respuestas inducidas solo podrían haber evolucionado en ambientes heterogéneos, donde las presas y los depredadores se encuentran frecuentemente, pero donde los depredadores nunca están ausentes ni son ubicuos (Via & Lande, 1985; van Tienderen, 1991; De Jong, 1995). Esto condice con lo observado en este estudio, donde las respuestas inducidas de los renacuajos de *P. thaul*, *P. bufoninum* y *R. spinulosa* se relacionan directamente con la alta heterogeneidad de los ambientes en los que se desarrollan, donde el riesgo de depredación es variable tanto a lo largo del tiempo dentro de un mismo humedal como entre humedales.

## CAPÍTULO V

EFECTO DE *RHIONAESCHNA VARIEGATA* (ODONATA: ANYSOPTERA) SOBRE LA  
MORFOLOGÍA Y EL DESARROLLO DE RENACUAJOS DE  
*PLEURODEMA* Y *RHINELLA*

## INTRODUCCIÓN

Los anfibios experimentan a lo largo de su ciclo de vida diferentes presiones ambientales tales como la desecación de los ambientes, la competencia y la depredación, aspectos que en parte han sido tratados en capítulos anteriores (Capítulos II-V). Una de las variables ambientales bióticas que ejerce mayor efecto sobre el desarrollo y la morfología de los anfibios es la depredación, particularmente en las etapas tempranas de su ciclo de vida, como en las fases embrionaria y larvaria (Vonesh, 2003). Por ejemplo, la disminución de la actividad se ha observado como una de las respuestas a la depredación más comunes en las larvas de anuros (Skelly, 1994; Rhichardson, 2001; Benard, 2004). Esta respuesta conductual reduce la capacidad de que la presa sea detectada por el depredador y además reduce la frecuencia de encuentro depredador-presa. Sin embargo, esta respuesta conductual implica un costo, asociado al hecho de que una disminución en la actividad, implica una disminución de las actividades de forrajeo. Esto se traduce en una disminución en la adquisición de recursos que reduce el crecimiento y el desarrollo del individuo (Danner & Joern, 2003).

Además de respuestas conductuales, los renacuajos despliegan otras respuestas frente a la presencia de depredadores por ejemplo, relacionadas con la morfología

(Smith & Van Buskirk, 1995; Relyea & Werner, 2000; Relyea, 2001 a y b; Kishida *et al.*, 2006; Richardson, 2006). Se ha observado, que en algunos casos los cambios morfológicos de los renacuajos pueden ser reversibles (Pfennig, 1992; Relyea, 2003; Kishida & Nishimura, 2006). Sin embargo, estos cambios requieren de una gran inversión de recursos por el individuo, por lo tanto estas respuestas fenotípicas a los depredadores involucrarían los llamados “costos” de plasticidad (por ejemplo, costos de producción y de mantenimiento) (De Witt *et al.*, 1998). Por ejemplo, Van Buskirk (2000), estudió los costos asociados a las respuestas a depredadores en diversas especies de anuros, observando que predominan aquellos que involucran disminución en el crecimiento.

Específicamente, entre los cambios morfológicos observados en renacuajos expuestos a sus depredadores se citan: incremento en la longitud de la cola, mayor desarrollo de la musculatura caudal, incremento en la altura de las aletas y aumento de la altura del cuerpo (*e.g.* Lardner, 1998; Van Buskirk & McCollum, 1999; Van Burskirk, 2001; Relyea, 2001a, 2003; Benard, 2004; Kishida & Nishimura, 2006; Kishida *et al.*, 2006; Richardson, 2006). Dichos cambios parecen seguir un patrón general a través de diferentes especies de anuros y con diferentes depredadores (Van Burskirk & McCollum, 1999; Relyea, 2001a; Teplitsky *et al.*, 2005). Sin embargo, de manera empírica ha sido poco estudiado cómo estos cambios morfológicos afectan el desempeño de las especies, y en última instancia la supervivencia. Uno de los métodos empleados para medir el efecto de la plasticidad de un rasgo morfológico sobre el desempeño y el fitness de los organismos es el denominado paradigma “morphology performance and fitness” de Arnold (Arnold, 1983). Este autor propuso la idea de que es posible medir directamente la relación de un rasgo morfológico y el fitness y que este estudio constituye dos pasos: el gradiente de performance (“performance gradient”) que

representa el efecto de un carácter sobre algún aspecto del desempeño del organismo (por ejemplo el desempeño en la natación) y el gradiente del fitness (“fitness gradient”) que representa el efecto de la performance en el fitness (por ejemplo la supervivencia). Siguiendo el método sugerido por Arnold, algunos autores han demostrado que tales cambios morfológicos mejoran la capacidad de natación del renacuajo, aumentado la probabilidad de evadir el ataque del depredador (Van Burskirk & McCollum, 1999; Dayton *et al.*, 2005; Teplitsky *et al.*, 2005). En otros casos, algunos cambios morfológicos se han asociado a otros fenómenos, como el de “lure effect” o distracción (Van Buskirk *et al.*, 2003), que consiste en que la cola del renacuajo atrae los ataques del depredador desviando la atención de áreas vitales como la cabeza y el tronco (Van Buskirk *et al.*, 2003). Como una adaptación extrema del fenómeno de distracción, los renacuajos de algunas especies de anuros desarrollan coloraciones llamativas en los extremos de la cola (Van Buskirk *et al.*, 2003; Richardson, 2006; Touchon & Warkentin, 2008).

También se ha visto que las respuestas conductuales y las respuestas morfológicas no están presentes cuando intervienen otras defensas como la producción de sustancias repelentes ó tóxicas. Se ha visto que ciertas especies no expresan cambios en la actividad o en la morfología frente a depredadores que las hallan poco palatables (Kiesecker *et al.*, 1996; Relyea, 2001 a y b; Jara & Perotti, 2009).

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto de náyades de *Rhionaeschna variegata* sobre características de la historia de vida (crecimiento y desarrollo) y de la morfología de renacuajos de *Pleurodema thaul*, *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*. Luego, se propone evaluar si la supervivencia de esos renacuajos experimentales difiere según su morfología y si ésta morfología se asocia con la capacidad de natación del renacuajo.

Resultados expuestos en capítulos anteriores, mostraron que las náyades del odonato *Rhionaeschna variegata*, son importantes depredadores de los anuros bajo estudio. Estos depredadores implican un riesgo de depredación en toda la fase larvaria de los anuros ya que no están limitados por el tamaño de la boca. Por otro lado, hemos encontrado que ante la presencia indirecta de este depredador los renacuajos reducen su actividad (Capítulo IV). En particular las especies de anuros aquí estudiadas difieren en el grado de palatabilidad, siendo los renacuajos pequeños de *Rhinella spinulosa* no palatables para este depredador. Por lo tanto, este sistema de presas y depredador permite realizar un estudio comparado de posibles respuestas inducidas por el depredador sobre renacuajos de *Pleurodema* y *Rhinella*.

Las hipótesis y predicciones a testear en este capítulo son:

Hipótesis 1: los renacuajos modifican el desarrollo y el crecimiento frente a la presencia de náyades de *Rhionaeschna variegata* (Odonata: Aeshnidae).

Predicción: los renacuajos de las especies de *Pleurodema* y *Rhinella* reducirían el desarrollo y el crecimiento en presencia del depredador como resultado de una disminución en la actividad.

Hipótesis 2: los renacuajos modifican su morfología en presencia de náyades de *Rhionaeschna variegata*.

Predicción: los renacuajos criados bajo la presencia del depredador presentarán una morfología inducida con cuerpos más altos y más cortos y colas con aletas más altas.

Hipótesis 3: la velocidad de escape de los renacuajos (la cual está relacionada con la morfología de los mismos) afecta la probabilidad de sobrevivir a un encuentro con un depredador.

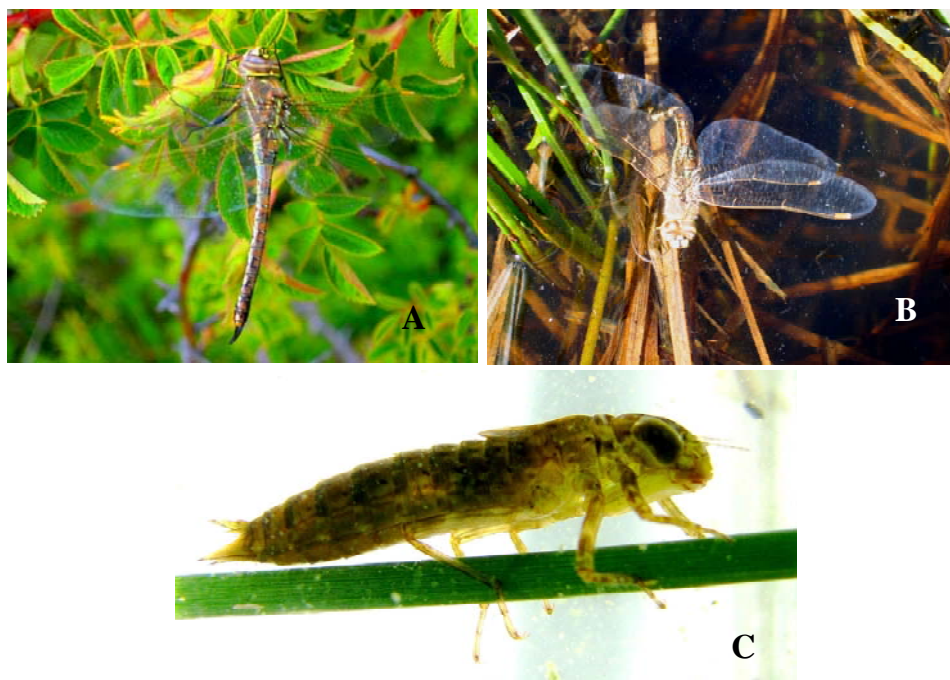


Predicción: los renacuajos con morfología inducida por el depredador alcanzarán una mayor velocidad de escape y por lo tanto una mayor supervivencia cuando son directamente expuestos al depredador.

## METODOLOGÍA

Para el estudio de la plasticidad en aspectos de la historia de vida y la morfología de los renacuajos se seleccionó a *Rhionaeschna variegata* (Fig. 1). Las náyades de este depredador alcanzan un gran tamaño (hasta 5 cm de longitud en sus últimos estadios, Fig. 1) y constituyen uno de los depredadores más frecuente en los ambientes estudiados. Además resultan depredadores efectivas de los renacuajos de las tres especies de anuros estudiadas (Capítulo III).

Figura 1. *Rhionaeschna variegata* (Odonata: Aeshnidae): (A) Adulto, (B) Hembra ovipositando sobre vegetación acuática en la Laguna Fantasma, (C) náyade.



Para probar las hipótesis planteadas para este capítulo se realizaron tres experimentos que se detallan a continuación, y que se basan en el método de Arnold (1983).

### **Experimento 1: Respuestas del desarrollo, del crecimiento y morfológicas de los renacuajos de las tres especies de anuros**

**Preparación y monitoreo del experimento.** Se colectaron 4 oviposturas de cada especie de anuro provenientes de la Laguna Fantasma para *Pleurodema thaul* y del humedal 1 de la localidad Ñireco para *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa*. Todas las oviposturas se mantuvieron en un cuarto bajo condiciones de fotoperíodo y temperatura controlados hasta la eclosión (12:12 L-O;  $18 \pm 1$  °C). La luz del cuarto fue proporcionada por 4

lámparas fluorescentes Philips daylight TLT 40W/54RS. Después de la eclosión las larvas provenientes de diferentes oviposturas fueron mezcladas y mantenidas en un predio externo al laboratorio de Fotobiología (INIBIOMA-CRUB, CONICET) en contenedores con agua de arroyo y alimentadas con un cultivo de algas y alimento para peces hasta alcanzar el estadio de desarrollo deseado para iniciar los experimentos.

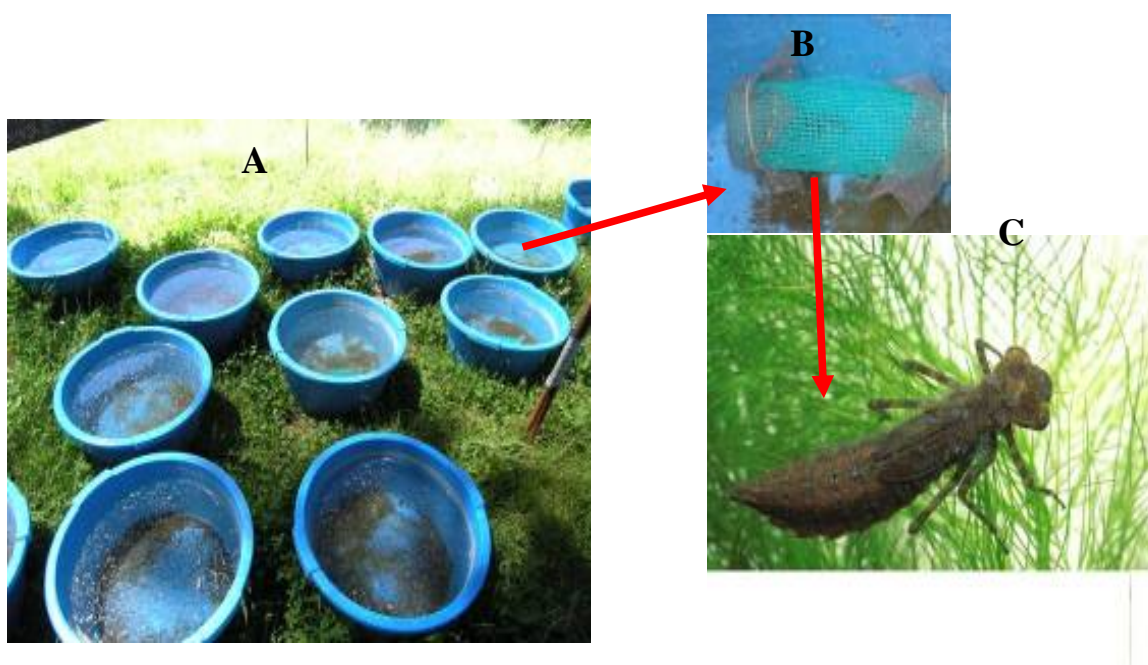
Se empleó un diseño completamente aleatorizado para cada especie de anuro. Los renacuajos de cada especie fueron criados bajo dos condiciones de depredación: presencia y ausencia (control) de náyades de *Rhionaeschna variegata*. Cada tratamiento fue replicado 10 veces. Los experimentos para *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* fueron realizados en la primavera de 2007, mientras que los experimentos para *Rhinella spinulosa* fueron realizados en la primavera de 2008.

Las unidades experimentales fueron contenedores circulares de plástico (34 cm de diámetro x 20 de alto) llenos con 15 litros de agua de arroyo, a los que se agregaron 500 ml de un cultivo mixto de algas (*Clamidomonas* sp. + *Scenedesmus* sp.) y 500 ml de sedimento fino de arroyo.

Los contenedores fueron dispuestos en el predio externo del laboratorio, bajo una malla tipo “media sombra” para evitar diferencias en la temperatura entre contenedores como así también el calentamiento excesivo del agua (Fig. 2). En noviembre de 2007 se introdujeron en cada contenedor, 6 renacuajos en estadio 26 de Gosner de cada una de las especies de *Pleurodema*. Además en cada contenedor se introdujo una jaula de plástico de 5 cm de diámetro y 10 cm de largo (Fig. 2); en el tratamiento con depredador se introdujo en la jaula una náyade de *Rhionaeschna variegata* proveniente de un lote de individuos colectados en el campo y mantenidos en el laboratorio (talla media = 28,99 mm  $\pm$  1,94 mm, n = 40). El tratamiento control

consistió en los mismos contenedores a excepción de que la jaula no contenía depredadores.

Figura 2. Diseño experimental para evaluar respuestas del crecimiento, del desarrollo y morfológicas inducidas por la presencia del depredador en renacuajos de tres especies de anuros. (A) Disposición de los contenedores experimentales, (B) jaula de plástico para contener al depredador en los tratamientos, (C) náyade de *Rhionaeschna variegata*.



El volumen de agua de los contenedores se mantuvo constante, revisando diariamente y reponiendo el volumen evaporado. Cada náyade de odonato fue alimentada en su jaula cada dos días con un renacuajo. De esta manera, los renacuajos experimentales recibían una combinación de señal química (cairomonas y señales derivadas de la digestión de los congéneres), visual y táctil a distancia del depredador (Wisenden, 2000; Schoeppner & Relyea, 2005; Richardson, 2006). Diariamente las

jaulas con el depredador fueron chequeadas y aquellos depredadores muertos o que dejaron de alimentarse fueron reemplazados por un nuevo ejemplar de tamaño similar. En general las náyades de odonatos consumen las presas en pocas horas, por lo que después de un día de no consumir la presa, se presupone que el individuo se encuentra enfermo o próximo a metamorfosear y por lo tanto cada individuo con estas características fue reemplazado por una nueva náyade.

A los 30 días de iniciados los experimentos, cada renacuajo fue pesado y determinado su estadio de desarrollo según Gosner (1960). Por otra parte, para estimar la presencia de variaciones morfológicas inducidas por el depredador los renacuajos fueron fotografiados. Se tomaron al menos 3 fotografías digitales de cada renacuajo en vista lateral con cámara digital Canon PowerShot SI S5. Para tomar las fotografías, cada renacuajo fue previamente anestesiado con una solución acuosa de benzocaína; luego se introdujo en una pecera de acrílico diseñada para este fin (de 3,5 cm x 2 cm x 7 cm para larvas de longitud total menor a 3,5 cm, o de 7 cm x 7 cm x 2 cm para larvas de más de 3,5 cm de longitud total). Para tomar cada fotografía se estandarizaron el modo y la distancia (modo P, distancia focal = 0). Posteriormente a la toma de fotografías, los ejemplares fueron devueltos a sus respectivos contenedores.

Al surgir el primer estadio 42 en alguna de las réplicas, todos los renacuajos del experimento se volvieron a pesar y fotografiar siguiendo la metodología descripta más arriba.

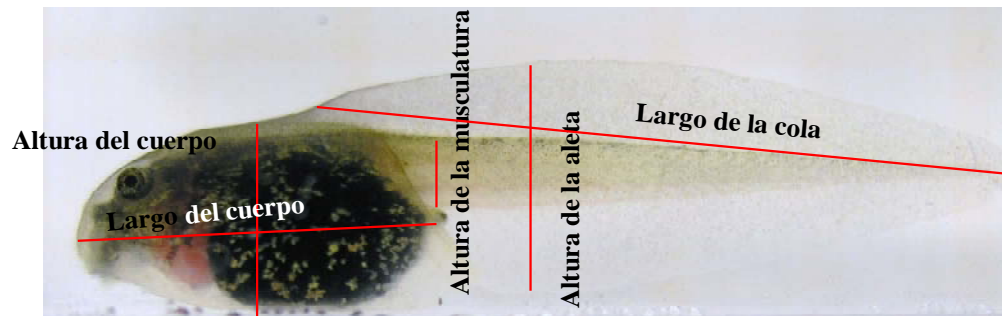
***Modificaciones del experimento para *Rhinella spinulosa*.*** Debido a que los renacuajos de *Rhinella spinulosa* no son palatables para las náyades de *Rhionaeschna variegata* en sus primeros estadios del desarrollo (Capítulo IV), se emplearon renacuajos en estadios palatables que corresponden a estadios más avanzados con respecto a los de *Pleurodema*. Por otro lado, el fondo de los contenedores fue cubierto con rocas

aplanadas colonizadas con perifiton, provenientes de humedales donde estos renacuajos habitan (Localidad Ñireco) y donde habitualmente ramonean sobre el perifiton (Jara, datos no publicados).

Los experimentos fueron conducidos de manera similar que para las especies de *Pleurodema*. Los renacuajos experimentales provinieron de un stock originado de la eclosión de 4 oviposturas de *Rhinella spinulosa* (media estadios Gosner  $\pm$  ES =  $31,5 \pm 0,78$ ; rango 30-33; Peso  $0,08 \text{ g} \pm 0,002 \text{ g}$ ; talla  $13,28 \text{ mm} \pm 1,25 \text{ mm}$ ). Por haber iniciado el experimento con renacuajos con estadios más avanzados, el primer estadio 42 surgió a los 25 días, por lo tanto los datos de estadio de desarrollo, de peso y de la morfología fueron registrados en una sola ocasión. Los náyades fueron alimentadas con renacuajos de *R. spinulosa* en estadios palatables (35-40) siguiendo el mismo protocolo descrito para *Pleurodema*.

**Análisis de las imágenes digitales.** Las fotografías digitales fueron analizadas mediante el software ImageJ (1.40q). Se tomaron cinco medidas morfológicas: longitud de la cola, longitud del cuerpo, alto del cuerpo, alto de la musculatura caudal y alto de las aletas (Fig. 3) (Smith & Van Buskirk, 1995; Relyea, 2001 a y b). De las tres fotos tomadas de cada renacuajo se obtuvo un promedio de cada medida morfológica.

Figura 3. Vista lateral de un renacuajo de *Pleurodema thaul* donde se indican las 5 medidas tomadas para analizar diferencias morfológicas inducidas por la presencia de *Rhionaeschna variegata*.



### **Experimento 2: desempeño o performance de la natación de los renacuajos**

Se condujo este experimento con el objetivo de evaluar si las respuestas morfológicas de los renacuajos provenientes del experimento 1 afectan la capacidad de escape de los renacuajos. Más específicamente, si los tratamientos del experimento 1 aplicados a los renacuajos alteran la velocidad de natación de estos facilitando su escape de posibles depredadores.

La velocidad de natación de los renacuajos fue estudiada siguiendo el protocolo de Teplitsky *et al.* (2005) con modificaciones. Se empleó un recinto experimental

formado por una pecera rectangular de acrílico de 8 cm x 40 cm x 6 cm, con fondo graduado cada 1 cm (Fig. 4).

Figura 4. Recinto experimental utilizado para medir las velocidades de natación de los renacuajos.



La pecera fue llenada hasta los 5 cm de profundidad con agua natural sin cloro. Sobre la pecera a 40 cm de altura se colocó una videograbadora en posición vertical sostenida por un trípode, de manera que el ángulo de enfoque cubriera completamente la pecera. Los renacuajos fueron testeados individualmente introduciéndolos en uno de los extremos de la pecera y dejándolos aclimatar durante 5 min. La velocidad de escape para cada renacuajo de cada especie fue registrada en tres oportunidades. Para inducir el escape del renacuajo se empleó una varilla delgada de acrílico, con la cual se dieron



pequeños toques sobre el extremo de la cola. La velocidad de natación de cada renacuajo fue registrada como el tiempo en que tardó en recorrer los primeros 5 cm luego de recibir el estímulo. Para los análisis estadísticos se empleó para cada renacuajo la máxima velocidad obtenida durante los tres registros. Como al momento de conducir los experimentos los renacuajos testeados presentaban diferentes tamaños y estadios del desarrollo, estas variables fueron tenidas en cuenta en los sucesivos análisis porque ambas variables influyen la velocidad de natación de los renacuajos (Wassersug & Sperry, 1977; Teplitsky *et al.*, 2005).

### **Experimento 3: Supervivencia de los renacuajos**

Para determinar si existen diferencias en la supervivencia entre los renacuajos expuestos y no expuestos al depredador, se realizaron experimentos de exposición directa. Se emplearon 10 renacuajos provenientes del tratamiento con depredador de réplicas diferentes y 10 renacuajos provenientes del tratamiento sin depredador en cada una de las tres especies de anuros. Como al final de los experimentos se contaba con renacuajos en diferentes tamaños, se seleccionaron los renacuajos de manera de minimizar las diferencias entre los tamaños dentro de cada especie. De esta manera nos aseguramos de eliminar el efecto del tamaño del renacuajo sobre la supervivencia. De igual forma, las náyades de *R. variegata* se seleccionaron minimizando las diferencias entre tallas, variable que influye la habilidad de captura de presas en estos depredadores. Así, los promedios de tallas y estadios de desarrollo utilizados fueron: *Pleurodema thaul*, talla: 48,39 mm  $\pm$  1,72 mm, estadio: 36  $\pm$  0,36 (Gosner, 1960); *Pleurodema bufoninum*, talla: 42,40 mm  $\pm$  1,42 mm, estadio: 35  $\pm$  0,4 (Gosner, 1960) y *Rhinella spinulosa*, talla: 33,12 mm  $\pm$  0,76 mm, estadio: 38  $\pm$  1,49 (Gosner, 1960). Cada renacuajo fue considerado como una réplica para estimar la supervivencia y fue colocado en un

recipiente de 24 cm x 12 cm x 5 cm con 1 litro de agua. Luego de 30 minutos de habituación se introdujo una náyade de odonato ( $38 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ ) en cada recipiente (réplica) y en dos oportunidades (a las 2 horas y a las 24 horas) se registró la supervivencia en cada réplica.

### **Análisis estadísticos**

**Desarrollo y crecimiento.** Los datos de desarrollo y crecimiento de las tres especies de anuros fueron analizados mediante test-*t* de Student o el test de Man-Whitney en caso de no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias (SigmaStat 3.5, 2006).

**Morfología.** Para analizar los efectos del depredador sobre la morfología de los renacuajos, se siguió el procedimiento conocido como “Shearing” (Bookstein, 1991). Para ello se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con todas las variables morfológicas. El primer componente principal (CP1) representa la variable del “tamaño corporal”, es decir que el CP1 puede ser considerado el estimador del tamaño (Dujardin, 2000). Solo aquellas variables morfológicas que están correlacionadas con el CP1 son las seleccionadas para el análisis (Van Buskirk & McCollum, 2000). En nuestro caso todas las variables resultaron significativamente correlacionadas con el CP1, por lo tanto fueron utilizadas en nuestro análisis (ver Apéndice III). Una vez seleccionadas las variables se realizó una regresión entre cada una de ellas y el CP1, para obtener los valores residuales que fueron empleados como las nuevas variables de “forma”. Este procedimiento ha sido extensamente utilizado en análisis morfológicos de diferentes grupos animales (Van Buskirk & Relyea, 1998; Van Buskirk & McCollum, 2000; Relyea, 2001; Grilli & Estallo, 2006; Laurila *et al.*, 2006; McCoy *et al.*, 2006).

Para analizar el efecto del depredador sobre las nuevas variables morfológicas se realizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA; SPSS, 1997). En el caso que los estadísticos Wilks lambda fueran significativos se usaron test univariados (ANOVA; SPSS, 1997).

***Desempeño en las carreras.*** Para analizar el efecto de los cambios morfológicos sobre la velocidad de natación en los renacuajos se empleó un ANCOVA de una vía para cada especie empleando como covariables el tamaño del renacuajo y el estadio del desarrollo (SPSS, 1997). En caso de que las covariables no fueran significativas las mismas serán removidas del modelo y se empleará un análisis de comparación de medias (test de  $t$  o Mann-Whitney).

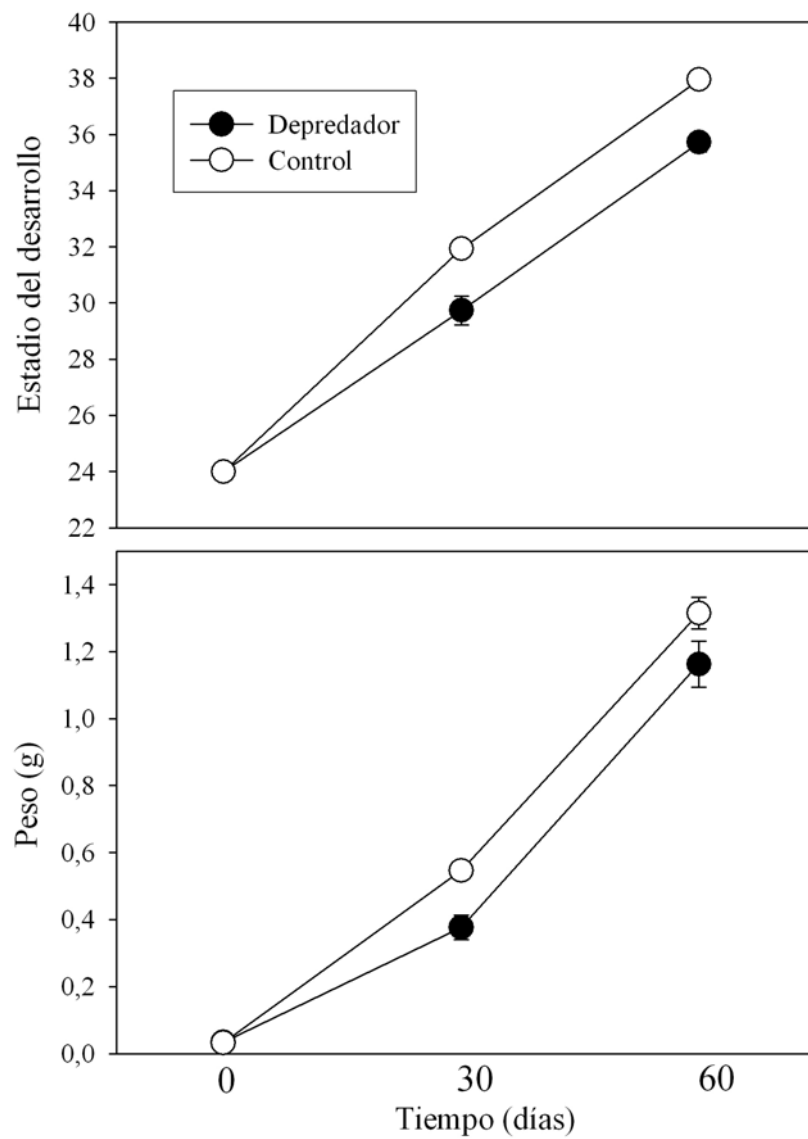
***Supervivencia.*** Para evaluar si la supervivencia de los renacuajos esta asociada con su fenotipo (no inducido vs inducido) se analizaron los datos a manera de una Tabla de Contingencia 2x2 empleando el test de Fisher para determinar los valores de  $P$ , debido a que el número de muestras y el tipo de datos no permitió utilizar el método de Chi cuadrado o el G test (Conover, 1980).

## RESULTADOS

**Experimento 1: Respuestas morfológicas y del desarrollo de los renacuajos de las tres especies de anuros****Desarrollo y crecimiento**

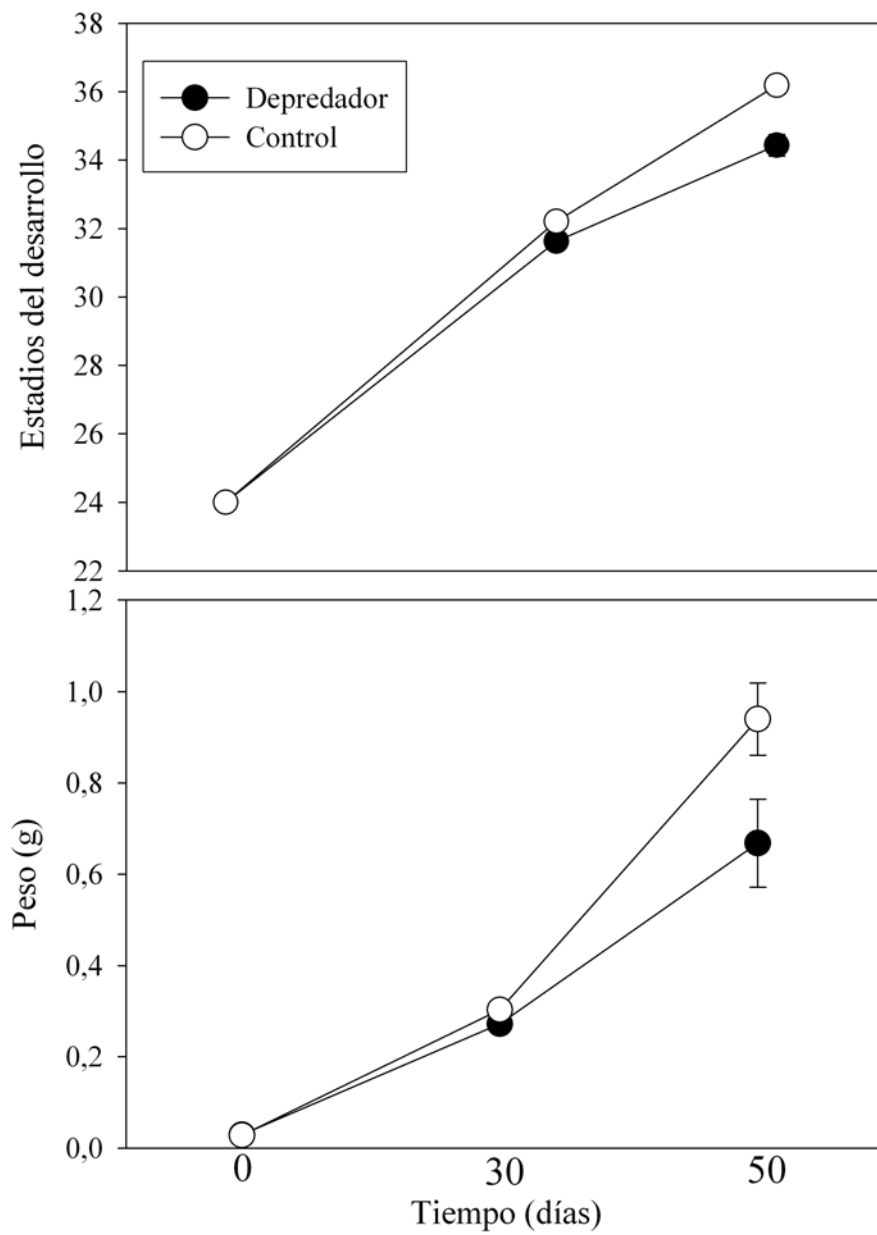
*Pleurodema thaul*. A los 30 días de iniciados los experimentos, tanto el desarrollo como el peso de los renacuajos fueron significativamente menores en el tratamiento con depredador respecto al tratamiento control (Fig. 5; desarrollo Mann-Whitney  $U = 9$ ,  $P = 0,004$ ,  $N = 20$ ; peso  $t = 3,81$ ,  $P = 0,001$ ,  $N = 20$ ). Al finalizar los experimentos (día 60) también se observaron diferencias significativas en el desarrollo de los renacuajos entre tratamientos, alcanzado los tratamientos con depredador un menor estadio de desarrollo (Fig. 5;  $t = 4,86$ ,  $P = 0,001$ ,  $N = 20$ ). Sin embargo, las diferencias en el peso de los renacuajos entre el tratamiento con depredador y el control no fueron significativas (Fig. 5;  $t = 1,77$ ,  $P = 0,09$ ,  $N = 20$ ).

Figura 5. Curvas de desarrollo y crecimiento en peso vivo (media  $\pm$  ES) de renacuajos de *Pleurodema thaul* obtenidas de los experimentos de plasticidad. Los círculos blancos indican el tratamiento control (sin depredador) y los círculos negros el tratamiento con depredador.



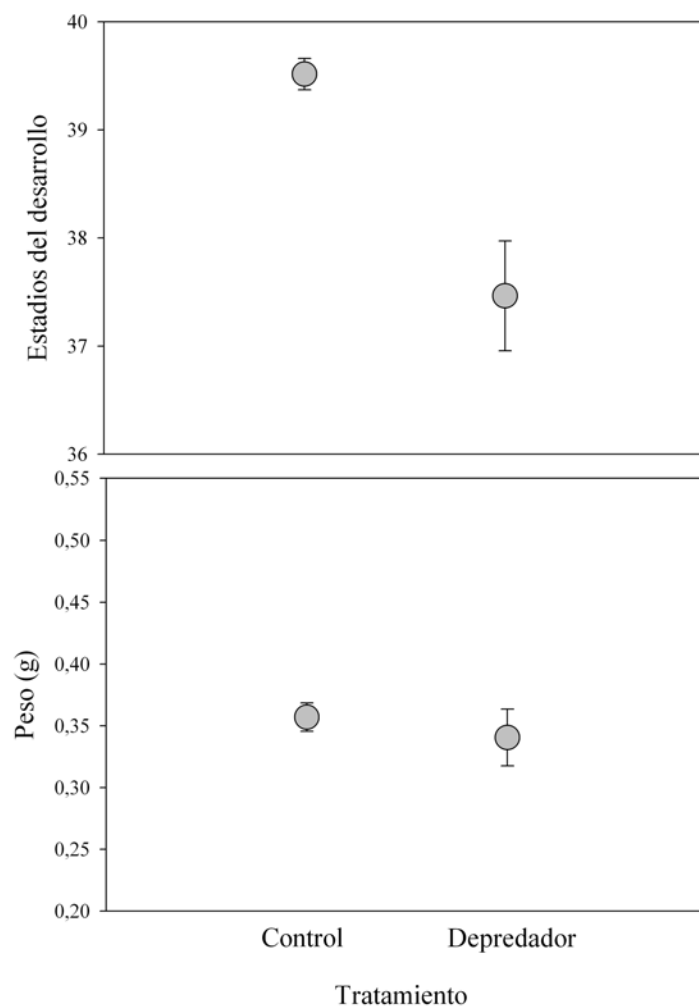
*Pleurodema bufoninum*. A los 30 días de iniciados los experimentos, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el desarrollo y en el peso de los renacuajos (Fig. 6; desarrollo Mann-Whitney  $U = 22$ ,  $P = 0,1$ ,  $N = 20$ ; peso  $t = 1,35$ ,  $P = 0,196$ ,  $N = 20$ ). Sin embargo al finalizar el experimento (día 50), el desarrollo y el peso de los renacuajos fue significativamente menor en el tratamiento con depredador respecto del control (Fig. 6; desarrollo Mann-Whitney  $U = 4$ ,  $P = 0,001$ ,  $N = 20$ ; peso  $t = 2,19$ ,  $P = 0,043$ ;  $N = 20$ ).

Figura 6. Curvas de desarrollo y crecimiento en peso vivo (media  $\pm$  ES) de renacuajos de *Pleurodema bufoninum* obtenidas de los experimentos de plasticidad. Los círculos blancos indican el tratamiento control (sin depredador) y los círculos negros el tratamiento con depredador.



*Rhinella spinulosa*. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el desarrollo de los renacuajos, siendo más tempranos los estadios de desarrollo en el tratamiento con depredador (Fig. 7; Mann-Whitney  $U = 81$ ,  $P = 0,004$ ,  $N = 20$ ). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos respecto al peso alcanzado por los renacuajos (Fig. 7;  $t = 0,66$ ,  $P = 0,517$ ,  $N = 20$ ).

Figura 7. Desarrollo y crecimiento en peso vivo (media  $\pm$  ES) de renacuajos de *Rhinella spinulosa* en los experimentos de plasticidad.





**Morfología**

*Pleurodema thaul*. A los 30 días de comenzado el experimento, la presencia del depredador afectó significativamente la morfología de los renacuajos de *Pleurodema thaul* (Wilks' Lambda = 0,476,  $P = 0,026$ ). Los renacuajos del tratamiento con depredador desarrollaron cuerpos más pequeños y altos, y colas más cortas con aletas altas y musculatura caudal baja (Tabla I; Fig. 8). A los 60 días del inicio del experimento (tiempo en el cual apareció el primer estadio 42) también se detectaron diferencias significativas en la morfología de los renacuajos (Wilks' Lambda = 0,28,  $P = 0,0028$ ). Los renacuajos del tratamiento con depredador desarrollaron cuerpos cortos con colas cortas y aletas altas (Tabla I; Fig. 9). No se observaron diferencias en la altura del cuerpo ni en la altura de la musculatura caudal.

Tabla I. Análisis univariados para las variables morfológicas de los renacuajos en los experimentos de plasticidad inducida por la presencia de depredadores en las tres especies de anuros. \* = tiempo en el cual surgió el primer estadio 42 (*sensu* Gosner, 1960) en los experimentos. Los valores de *P* en negrita indican valores significativos para la variable.

<i>Pleurodema thaul</i>	df	<i>F</i>	<i>P</i>
30 días			
largo de la cola	1	2,683	0,120
largo del cuerpo	1	4,448	<b>0,050</b>
altura del cuerpo	1	12,542	<b>0,003</b>
altura de las aletas	1	14,069	<b>0,002</b>
altura de la musculatura	1	7,246	<b>0,015</b>
60 días*			
largo de la cola	1	7,564	<b>0,014</b>
largo del cuerpo	1	20,333	<b>0,000</b>
altura del cuerpo	1	0,132	0,721
altura de las aletas	1	19,494	<b>0,000</b>
altura de la musculatura	1	0,207	0,655
<i>Pleurodema bufoninum</i>			
30 días			
largo de la cola	1	0,068	0,798
largo del cuerpo	1	6,329	<b>0,025</b>
altura del cuerpo	1	0,448	0,514
altura de las aletas	1	16,308	<b>0,001</b>
altura de la musculatura	1	1,604	0,226
50 días*			
largo de la cola	1	1,656	0,216
largo del cuerpo	1	18,089	<b>0,001</b>
altura del cuerpo	1	5,735	<b>0,029</b>
altura de las aletas	1	21,194	<b>0,000</b>
altura de la musculatura	1	0,327	0,575
<i>Rhinella spinulosa</i>			
25 días*			
largo de la cola	1	0,182	0,675
largo del cuerpo	1	0,035	0,854
altura del cuerpo	1	0,056	0,815
altura de las aletas	1	0,100	0,756
altura de la musculatura	1	0,151	0,703

Figura 8. Morfotipos de renacuajos de *Pleurodema thaul* resultantes a los 30 días del comienzo del experimento de plasticidad A) inducidos (presencia del depredador) y B) no inducidos (ausencia del depredador).

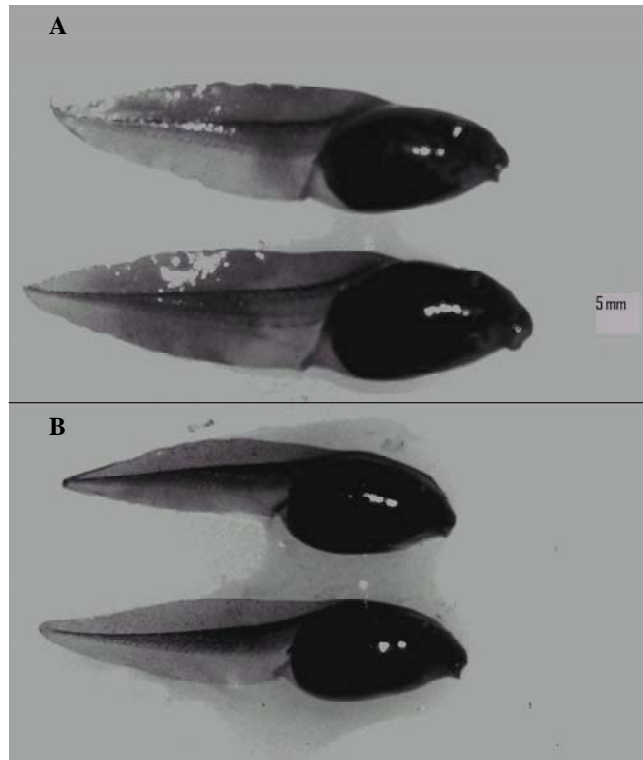
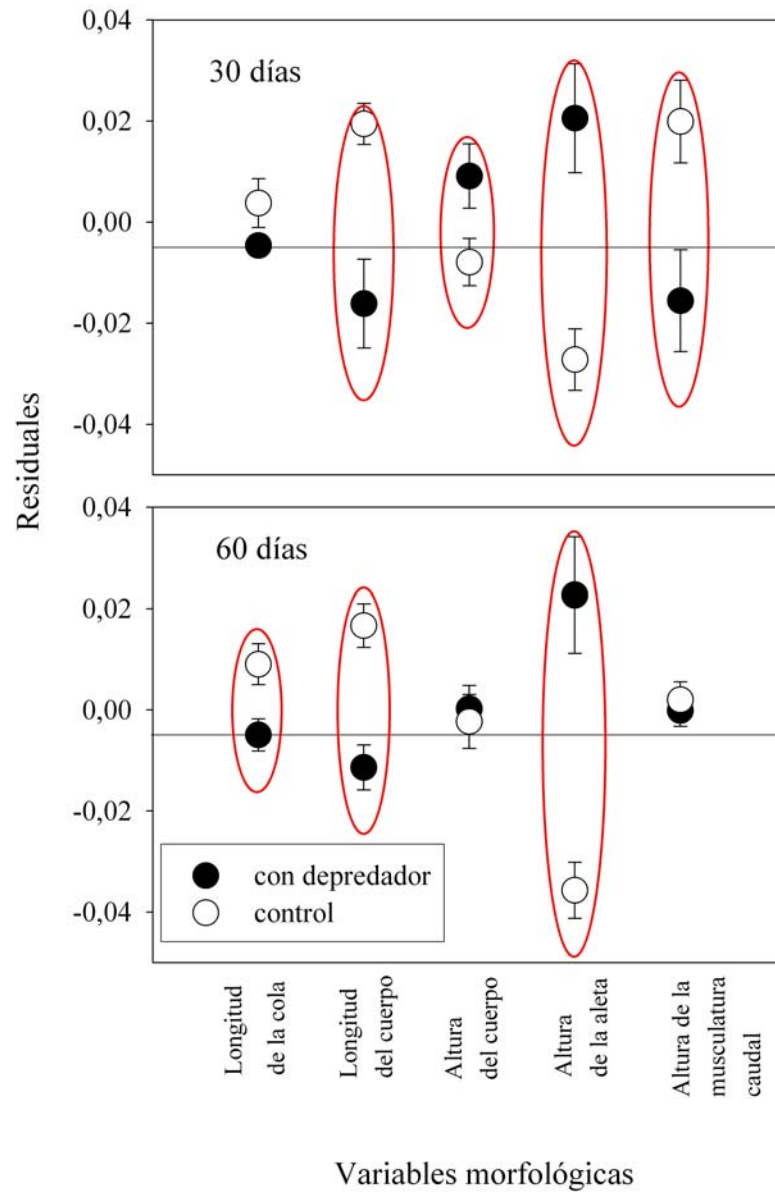


Figura 9. Morfología relativa de los renacuajos de *Pleurodema thaul* a los 30 y 60 días del comienzo del experimento, con o sin depredador. Cada punto representa la media de los residuales  $\pm$  ES. Las elipses indican diferencias significativas entre las variables.



*Pleurodema bufoninum*. Se observaron cambios en la morfología de los renacuajos de *P. bufoninum* a los 30 días del inicio del experimento (Wilks' Lambda = 0,363,  $P = 0,043$ ). Los renacuajos del tratamiento con depredador mostraron diferencias significativas con cuerpos más pequeños y aletas más altas (Tabla I; Fig. 10). A los 50 días de iniciado el experimento (tiempo en el cual surgió el primer estadio 42) también se observaron diferencias significativas en la morfología de los renacuajos (Wilks' Lambda = 0,223,  $P = 0,001$ ). Los renacuajos del tratamiento con depredador desarrollaron cuerpos más cortos y bajos y aletas altas (Tabla I; Fig. 10). No se observaron diferencias en la longitud de la cola y la altura de la musculatura (Tabla I).

*Rhinella spinulosa*. Los renacuajos de *R. spinulosa* no mostraron plasticidad morfológica entre tratamientos en las variables medidas (Wilks' Lambda = 0,967,  $P = 0,993$ ) (Tabla I; Fig. 11).

Figura 10. Morfología relativa de los renacuajos de *Pleurodema bufoninum* a los 30 y 50 días del comienzo de los experimentos, con y sin depredador. Cada punto representa la media de los residuales  $\pm$  ES. Las elipses indican diferencias significativas entre las variables.

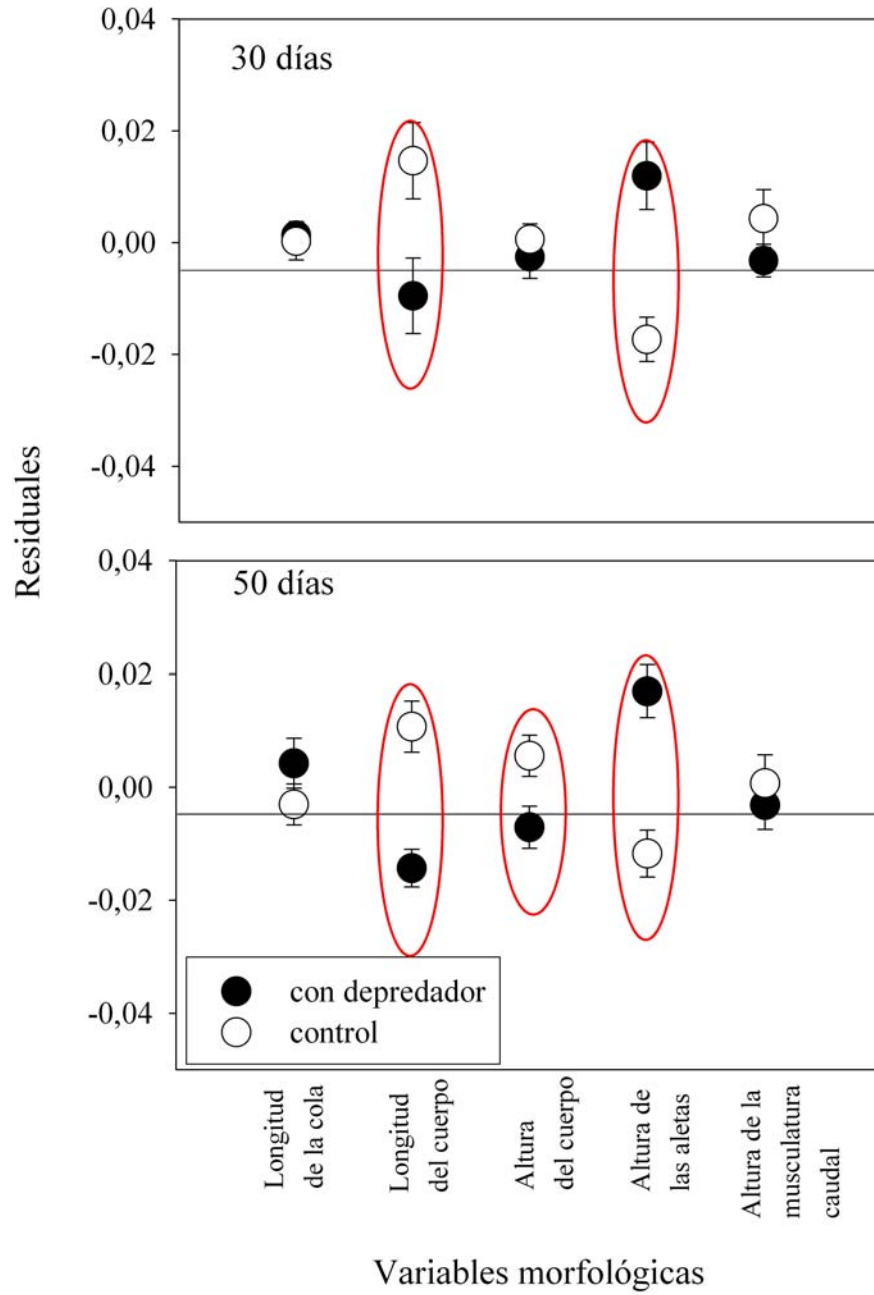
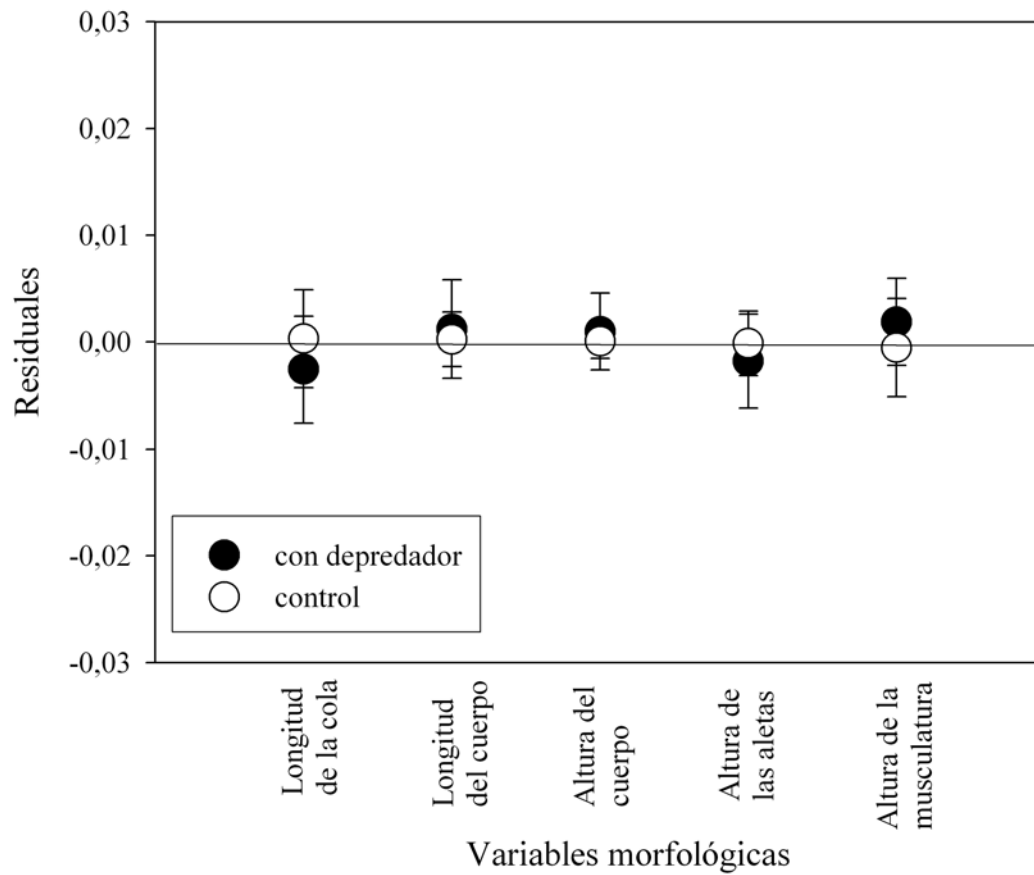


Figura 11. Morfología relativa de los renacuajos de *Rhinella spinulosa* al finalizar los experimentos de plasticidad. Cada punto representa la media de los residuales  $\pm$  ES.



**Experimento 2: Desempeño o “performance” de la natación de los renacuajos**

*Pleurodema thaul*. Las covariables tamaño del renacuajo y estadio del desarrollo no afectaron las velocidades de natación de los renacuajos (covariable tamaño  $P = 0,204$ ; covariable estadio del desarrollo  $P = 0,38$ ). Los renacuajos con morfología inducida no mostraron diferencias significativas en la velocidad de natación respecto de que aquellos provenientes del tratamiento control, es decir los renacuajos no inducidos (velocidad promedio  $\pm$  ES, renacuajos control =  $20,75 \text{ cm.s}^{-1} \pm 2,44 \text{ cm.s}^{-1}$ ; renacuajos inducidos =  $24,93 \text{ cm.s}^{-1} \pm 1,06 \text{ cm.s}^{-1}$ ; Mann-Whitney  $U = 53$ ,  $P = 0,26$ )

*Pleurodema bufoninum*. Las covariables tamaño del renacuajo y estadio del desarrollo no afectaron las velocidades de natación de los renacuajos (covariable tamaño  $P = 0,8$ ; covariable estadio del desarrollo  $P = 0,5$ ). El tratamiento no afectó las velocidades de natación de los renacuajos (velocidad promedio  $\pm$  ES, renacuajos control =  $13,71 \text{ cm.s}^{-1} \pm 1,33 \text{ cm.s}^{-1}$ , renacuajos inducidos =  $14,71$ ,  $t = -1,22$ ,  $P = 0,24$ ).

*Rhinella spinulosa*. La covariable tamaño del renacuajo no afectó las velocidades de natación ( $F_{1,17} = 1,16$ ,  $P = 0,29$ ), pero si el estadio del desarrollo ( $F_{1,17} = 5,93$ ,  $P = 0,027$ ). Los renacuajos control y los renacuajos expuestos al depredador no mostraron diferencias en las velocidades de natación (velocidad promedio  $\pm$  ES, renacuajos control =  $18,52 \text{ cm.s}^{-1} \pm 2,1 \text{ cm.s}^{-1}$ , renacuajos inducidos =  $23,33 \text{ cm.s}^{-1} \pm 1,63 \text{ cm.s}^{-1}$ ;  $F_{1,17} = 1,38$ ,  $P = 0,256$ ).



**Experimento 3: Supervivencia de los renacuajos**

En ambas especies de *Pleurodema* los renacuajos provenientes de los tratamientos con depredador (fenotipo inducido) mostraron a las dos primeras horas del experimento una tendencia a una mayor supervivencia, pero que no fue estadísticamente significativa (*Pleurodema thaul*  $P = 0,58$ ; *P. bufoninum*  $P = 0,35$ ) (Fig. 12). Los renacuajos de *P. thaul* provenientes del tratamiento con depredador, a las 24 horas presentaron un 30 % de supervivencia, mientras que los renacuajos provenientes del tratamiento control (fenotipo no inducido) fueron consumidos en su totalidad; sin embargo estas diferencias no fueron significativas ( $P = 0,21$ ) (Fig. 12). Por otro lado, todos los renacuajos de *P. bufoninum* presentaron 0 % de supervivencia a las 24 horas de exposición directa.

Con respecto a *Rhinella spinulosa*, a las dos horas de iniciados los experimentos los renacuajos no mostraron una diferencia en la supervivencia entre aquellos provenientes del tratamiento con depredador y los renacuajos provenientes del control ( $P = 0,65$ ) (Fig. 13). A las 24 horas del experimento no se observaron diferencias en la supervivencia de los renacuajos, presentando ambos tratamientos la misma supervivencia (40 %) (Fig. 13).

Figura 12. Supervivencia porcentual de los fenotipos inducidos y no inducidos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* a 2 y 24 horas del comienzo del experimento de depredación directa por *Rhionaeschna variegata*. En rojo se representa mortalidad y en negro la supervivencia.

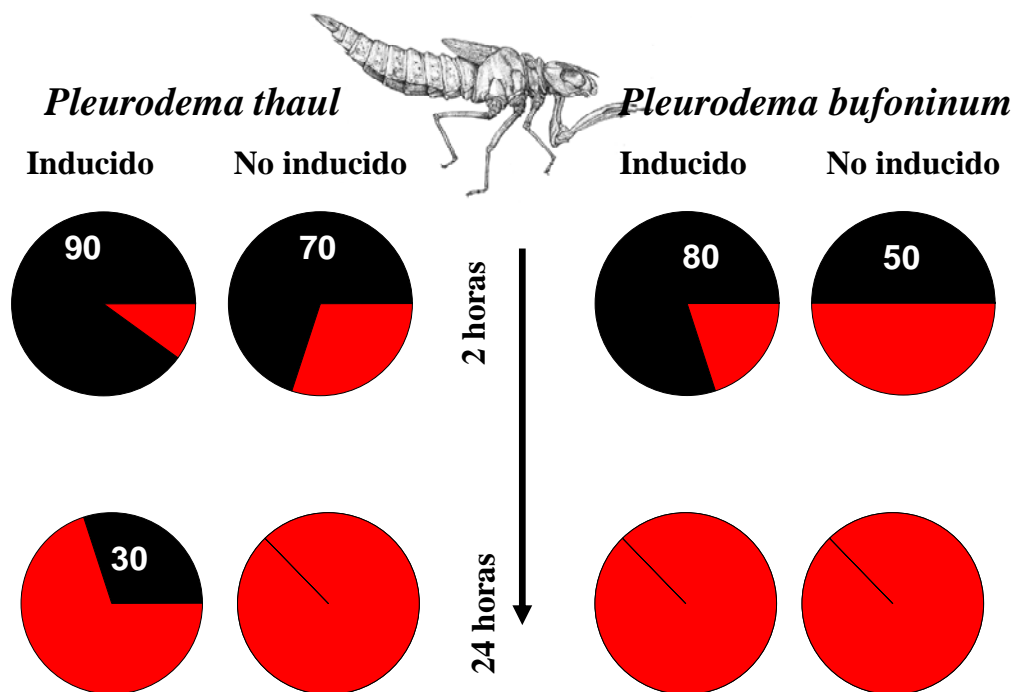
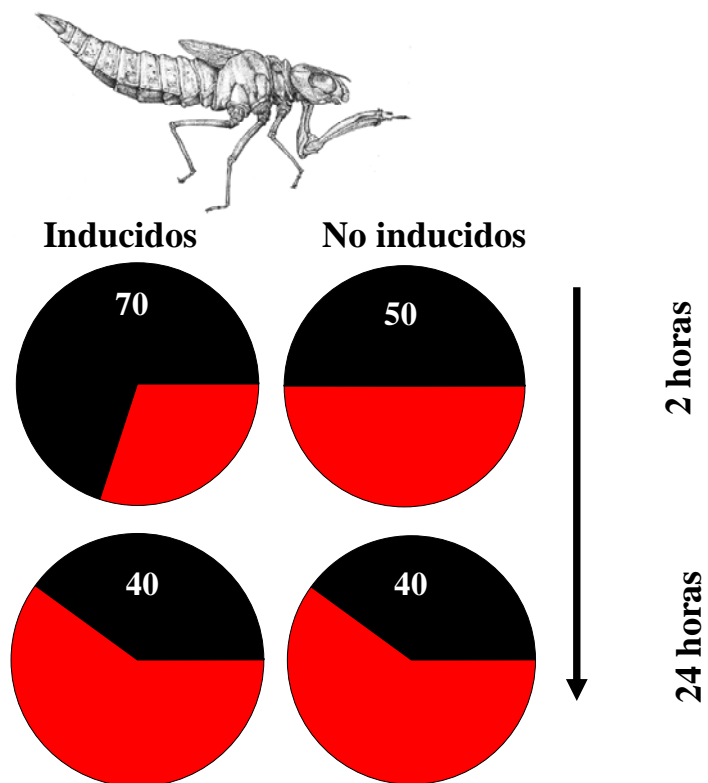


Figura 13. Supervivencia porcentual de los fenotipos inducidos y no inducidos de renacuajos de *Rhinella spinulosa* a las 2 y 24 horas en los experimentos de depredación directa por *Rhionaeschna variegata*. En rojo se representa la mortalidad y en negro la supervivencia.



## DISCUSIÓN

*Respuestas plásticas del desarrollo y del crecimiento de los anuros frente a la depredación*

Tanto la presencia directa de depredadores como la indirecta influyen en diferentes aspectos de la ecología de las presas (Werner & Peacor, 2003; Peacor & Werner, 2004; Stav *et al.*, 2007). En organismos con ciclos de vida complejos tales como anfibios y diferentes invertebrados, la presencia de depredadores modifica aspectos de sus ciclos de vida como el desarrollo embrionario, el desarrollo larvario y el tamaño a la metamorfosis (Peckarsky *et al.*, 2001; Vonesh, 2003; Vonesh & Osenberg, 2003; Vonesh & Warkentin, 2006; Orizaola & Braña, 2004, 2005). En este trabajo se observó que los anuros estudiados presentan modificaciones tanto en el desarrollo como en el crecimiento larvario ante la presencia indirecta de náyades de odonatos. Analizando las diferentes especies se observa que las respuestas plásticas son similares en las especies estudiadas del género *Pleurodema*. Los renacuajos de *Pleurodema bufoninum* y *P. thaul* reducen su crecimiento y su desarrollo en presencia de náyades de odonatos. Al respecto, un gran número de trabajos reportan diferencias y similitudes en las respuestas de diferentes especies frente a la presencia de invertebrados depredadores (Tabla II). Dentro de las especies que responden a sus depredadores se observan dos patrones de respuesta: 1) acelerar el desarrollo a expensas de un tamaño menor del metamorfo o 2) desarrollarse más lentamente y alcanzar un tamaño de metamorfo mayor. En ambos casos la respuesta plástica involucra un costo. Estos costos pueden evidenciarse rápidamente durante la vida del renacuajo o pueden expresarse en estadios más tardíos de su ciclo de vida (Álvarez & Nicieza, 2002). Por ejemplo, metamorfos que alcanzan un tamaño menor tienen menor probabilidad de sobrevivir como juveniles. También puede verse retardado el momento de la madurez sexual y de la primera

reproducción, así como la fecundidad (Howard, 1980; Berven, 1981; Smith, 1987). En algunos trabajos se ha demostrado que ambientes larvarios con alto riesgo de depredación se correlacionan con juveniles con miembros más cortos (Van Buskirk & Saxer, 2001; Nieceza *et al.*, 2006). Juveniles con miembros más cortos podrían sufrir mayor depredación que aquellos que poseen miembros más largos, ya que disminuiría su capacidad de evadir mejor el ataque de un depredador. Sin embargo esta variación en la morfología de los juveniles no parece afectar al desempeño o “performance” de salto de los mismos, por lo que se concluye que el menor tamaño a la metamorfosis es el mayor costo postmetamorfico que experimentan aquellos renacuajos que se desarrollaron en ambientes con mayor riesgo de depredación (Nieceza *et al.*, 2007). Por otro lado según estos autores, aquellas modificaciones fenotípicas inducidas durante el desarrollo larval tendrían poco efecto en la “performance” o desempeño del juvenil. Sugieren que si las modificaciones en la fase larvaria tuvieran un efecto negativo sobre el desempeño del juvenil, entonces las fuerzas de la selección en la fase terrestre podrían eliminar la plasticidad larvaria. Por otro lado, si el período larvario se prolongara, entonces los renacuajos estarían sujetos más tiempo al riesgo por depredación y su mortalidad también se vería incrementada por el riesgo a la desecación en aquellos casos de anuros de ambientes temporarios.

Aunque los objetivos del presente trabajo no fueron evaluar los efectos de la plasticidad en la fase larvaria y su efecto en el desempeño de los juveniles de estas especies, futuros estudios deberían analizar si la plasticidad larvaria modifica de alguna manera el desempeño de los individuos en la fase terrestre; esto adquiere relevancia teniendo en cuenta que los metamorfos de estas especies deben afrontar climas bastante adversos como largos inviernos y una variedad de potenciales depredadores como aves y mamíferos.

Se observó que la presencia de náyades de odonatos reduce la actividad en las tres especies de anuros estudiadas (Capítulo IV) por lo que la disminución en el crecimiento y el desarrollo observadas en este capítulo podrían ser una consecuencia indirecta de esta respuesta comportamental. Tasas de actividad mayores a menudo resultan en mayor adquisición de recursos y por lo tanto en un mayor crecimiento corporal. Por el contrario una disminución en la actividad o evitación de las áreas con depredadores se traducen en la naturaleza en bajas tasas de crecimiento corporal (Skelly, 1992; Schmitz *et al.*, 1997; Relyea & Werner, 1999). Si bien en este trabajo no se evaluó la evitación espacial y el uso de refugios, es posible que estas conductas tengan implicancias importantes en la ecología de estas especies en condiciones naturales, sobre todo teniendo en cuenta la alta complejidad estructural de muchos de los humedales habitados por estas especies. Por otro lado, la alta densidad de depredadores en las áreas vegetadas podría involucrar un alto riesgo de depredación respecto de aquellas áreas no vegetadas, por lo que podríamos suponer que durante el desarrollo los renacuajos evitarían estas áreas.

Las náyades de odonatos solo afectaron el desarrollo de los renacuajos de *Rhinella spinulosa*, produciendo un retardo en el desarrollo. Nuestros resultados difieren de los encontrados por Stav *et al.* (2007) quienes observaron que renacuajos de *Bufo viridis* metamorfosean antes y a un peso mayor en los tratamientos con náyades de odonatos. Sin embargo estos autores argumentan que tal diferencia podría deberse a que en los contenedores con depredador la liberación de excretas de los mismos aumentarían los recursos por incremento de materia orgánica. En general, se espera que las respuestas de las presas a sus depredadores tengan un costo asociado (Anholt *et al.*, 1996; Van Buskirk, 2000), hipótesis que ha sido corroborada por ejemplo, en el caso en que las tasas de desarrollo rápidas están asociadas a una reducción en el tamaño del

metamorfo (Lardner, 2000). En el caso de las especies de *Pleurodema* estudiadas el costo podría estar asociado al tiempo en que los renacuajos permanecen en el humedal, ya que incrementarían su mortalidad por el riesgo de desecación. En el caso de *Rhinella* el costo podría estar asociado al tiempo en que los renacuajos permanecen en el humedal, ya que incrementarían su riesgo a ser depredados, sobre todo, en estadios tardíos cuando son palatables para las náyades de odonatos (Jara & Perotti, 2009).

### *Cambios morfológicos inducidos por depredadores*

Los cambios morfológicos de las presas inducidos por depredadores implican una gran inversión de recursos y un costo que se traduce en un menor desempeño de los fenotipos inducidos en ambientes libres de depredadores (McCollum & Van Buskirk, 1996). Por ejemplo, la inducción de espinas, yelmos y crestas en organismos del zooplancton reduce fuertemente el potencial reproductivo como así también otros aspectos ligados al fitness o éxito (Boeing, 2002 y trabajos citados en este).

Los renacuajos de *Pleurodema* alteraron significativamente su morfología en presencia de náyades de odonatos, específicamente desarrollaron cuerpos más cortos y colas más altas, rasgos que también han sido observados en otras especies por diferentes autores y que se han asociado con el fenómeno de “lure effect” (Van Buskirk, 2003; Teplitsky *et al.*, 2005).

La reducción en el tamaño corporal de los renacuajos expuestos ha depredadores, ha sido propuesta como una respuesta plástica no adaptativa debido a que, un mayor tamaño corporal aumenta la supervivencia de los renacuajos frente a depredadores limitados por el tamaño de la boca (“gape-limited”) (Richard & Bull, 1990; Semlitsch, 1990). Para algunos autores esta respuesta plástica (reducción del

tamaño corporal) es una consecuencia indirecta de una respuesta conductual adaptativa como lo es la reducción de la actividad (Lardner, 1998). Asimismo, esta respuesta plástica tendría pocas implicancias en la supervivencia de los renacuajos expuestos a depredadores como náyades de odonatos, que no son depredadores “gape-limited”. La reducción proporcional de áreas del cuerpo más comprometidas, como la cabeza y el cuerpo del renacuajo, reducen la probabilidad que el depredador provoque daños en estas áreas vitales, en comparación con áreas menos vitales como la cola (Van Buskirk *et al.*, 2003; Johnson & Eidiotis, 2005).

*Efecto de los depredadores sobre la morfología, desempeño de la natación y éxito o eficacia biológica de los renacuajos*

Los renacuajos de *Pleurodema* en presencia de náyades de odonatos desarrollaron colas más altas que los renacuajos no expuestos (control) a estos depredadores, respuesta que ha sido ampliamente observada en diferentes grupos de anfibios como ránidos e hílidos (Tabla II). La misma respuesta se observa en renacuajos expuestos a otros invertebrados depredadores (Tabla II). Algunos autores han propuesto que tal respuesta morfológica se debe a que la parte anterior de la cola del renacuajo es la principal fuente de propulsión durante la natación (Wassersug & Hoff, 1985), por lo tanto la altura de la cola estaría correlacionada con la velocidad de la natación, siendo ésta más rápida cuando las aletas caudales son más altas (McCollum & Leimberger, 1997). En este trabajo no hemos observado diferencias estadísticas en la velocidad de nado entre los fenotipos inducidos de las especies de *Pleurodema*, ni tampoco una mayor supervivencia de los mismos. Sin embargo, se observó una tendencia a que las velocidades sean mayores en los fenotipos inducidos de *P. thaul* y una tendencia a que los fenotipos inducidos de ambas especies de *Pleurodema* sobrevivan mayor tiempo a la



presencia de depredadores. Los resultados del experimento de natación podrían deberse a que estas respuestas morfológicas no estén solamente asociadas a la velocidad de nado. Al respecto, Teplitzky *et al.* (2005) encontraron que los renacuajos de *Rana dalmatina* alteran su morfología en presencia de náyades de odonatos y estos cambios tampoco se asociaron a la velocidad de natación. Según la modalidad de caza de los depredadores, se han hallado ciertos patrones en cuanto a las respuestas morfológicas inducidas en renacuajos (Teplitzky *et al.*, 2005). Por ejemplo, renacuajos expuestos a depredadores que persiguen a sus presas, como los peces, es más probable que presenten respuestas que cumplan el paradigma morfología-desempeño-éxito (“morphology-performance-fitness”) propuesto por Arnold (1983). Es de esperar entonces que, los caracteres morfológicos aumenten la capacidad de natación (desempeño) y les permitan una mayor supervivencia (Teplitzky *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha visto que renacuajos expuestos a depredadores que acechan a sus presas (por ejemplo insectos) producen respuestas morfológicas inducidas, que resultan en distraer a los depredadores hacia áreas corporales con menor riesgo vital, como la cola (“lure effect”) (Van Buskirk, 2003). Sin embargo, podría postularse también que dichos cambios morfológicos resulten en un incremento en la velocidad de natación. Al respecto, se puede afirmar que los depredadores más importantes de los anuros estudiados aquí son insectos acuáticos, la mayoría de los cuales despliegan estrategias del tipo “sit-and-wait”. Por lo tanto, la interacción de los renacuajos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* con estos depredadores induce respuestas morfológicas que podrían explicarse con la hipótesis de “lure effect”. Serían necesarios nuevos experimentos para confirmar si los resultados obtenidos se deben a que se utilizaron pocas unidades experimentales o si estas respuestas morfológicas están explicadas por el mecanismo de distracción o “lure effect”.

A pesar de que no hubo diferencias estadísticas significativas en la supervivencia, la tendencia observada fue un tiempo mayor de supervivencia en los fenotipos inducidos. Los experimentos de depredación realizados en esta tesis fueron conducidos en contenedores de tamaño reducido y en ausencia de complejidad estructural como la vegetación. En la naturaleza los renacuajos de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* habitan ambientes de alta complejidad estructural mayormente dada por los diferentes tipos de macrófitas, que proveen de refugios que les permiten evadir a muchos de sus depredadores. Por lo tanto, a futuro sería interesante evaluar la supervivencia de estos fenotipos en recintos experimentales que simulen mejor las condiciones de la naturaleza de estas especies.

Trabajos recientes han demostrado que los renacuajos de algunas especies de anuros desarrollan colas más conspicuas, que involucran un incremento de manchas de colores llamativos cuando están en presencia de depredadores. Al respecto, en las especies estudiadas no observamos que los renacuajos presenten o intensifiquen algún patrón de coloración en las aletas y colas, por ejemplo, las aletas de los renacuajos de *Pleurodema* son casi completamente transparentes, aún en presencia de depredadores. La transparencia de las aletas también puede ser una estrategia de coloración críptica apta para vivir en la columna de agua. Los renacuajos de *Pleurodema* presentan en general coloraciones que las hacen crípticas en sus hábitats y podríamos suponer que de esta manera resultarían menos visibles para sus depredadores. Por el contrario los renacuajos de *Rhinella spinulosa*, al igual que muchas otras especies de la familia Bufonidae, presentan coloración uniformemente oscura, lo que sumado al comportamiento gregario los convierte en renacuajos muy conspicuos y fáciles de depredar (Wassersug, 1973). La evolución del melanismo y del comportamiento de agregación en estas especies, se ha asumido como una adaptación para absorber la

mayor radiación solar posible (Wassersug, 1973). Por otro lado el desarrollo de la inpalatabilidad serviría como una estrategia disuasiva para potenciales depredadores.

Hasta el momento se ha reportado un único caso en donde una especie de *Rhinella*, *Rhinella schneideri*, muestra cambios morfológicos inducidos por un depredador (Tabla II: Kehr & Gómez, 2009). Estos cambios morfológicos fueron hallados tanto en la longitud del cuerpo como en la longitud del intestino de los renacuajos. En nuestro caso, los renacuajos de *Rhinella spinulosa* no mostraron respuestas morfológicas inducidas en presencia de náyades de odonatos, coincidiendo estos resultados con los observados en otras especies de bufónidos (Relyea, 2001 a y b; Benard & Fordyce, 2003). Estos autores encontraron una relación entre la palatabilidad y los cambios morfológicos en bufónidos. En general, los renacuajos poco palatables como lo son algunas especies de bufónidos, no cambian su morfología en presencia de depredadores. Esto concuerda con nuestros resultados al no observar respuestas comportamentales ni morfológicas en renacuajos de *R. spinulosa*, que resultaron ser no palatables en algunos estadios (Capítulo IV). En estos estadios los renacuajos no alteran su actividad frente a náyades de odonatos, indicando que no resulta necesario inducir morfologías que disminuyan su riesgo de mortalidad ante un posible depredador. La presencia simultánea de diferentes tipos de estrategias de defensa (toxinas, morfología inducida, cambio en el comportamiento) podría resultar muy costosa (ya sea en costos de formación de estructuras, de mantenimiento u operativos -“Allocation costs”- (Tollrian & Harvell, 1998), por lo que la presencia de defensas químicas parecería ser lo suficientemente efectiva para aumentar la supervivencia de los renacuajos e implicaría un menor costo en estas especies.

Tabla II. Resumen de algunos trabajos donde se ha analizado el efecto de invertebrados depredadores sobre la historia de vida y morfología de renacuajos de anuros. TC = tasa de crecimiento larvario.\* = en presencia de mayor alimento.---- = caracteres no estudiados.

Especie de anuro	Invertebrado depredador	Efecto sobre				Fuente bibliografica
		Tamaño metamorfo	Tiempo en metamorfosar	TC	Cambio morfologico inducido	
<i>Bufo americanus</i>	náyade de odonato	pequeño	ninguno	----	----	Skelly & Werner, 1990
<i>Bufo boreas</i>	notonéctido	ninguno	Corto	----	----	Chivers <i>et al.</i> , 1999
<i>Bufo bufo</i>	náyade de odonato	ninguno	Corto	----	----	Laurila <i>et al.</i> , 1998
<i>Bufo bufo</i>	larva de coleóptero	pequeño	Corto	----	reducción en la altura de la aleta caudal	Lardner, 2000
<i>Bufo calamita</i>	larva de coleóptero	ninguno	ninguno	ninguno	Ninguno	Lardner, 2000
<i>Bufo viridis</i>	náyade de odonato	grande	Corto	----	----	Stav <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhinella schneideri</i>	belostomátido	----	----	----	mayor longitud de la cola y del intestino	Kehr & Gómez, 2008
<i>Hyla arborea</i>	larva de coleóptero	ninguno	ninguno	ninguno	mayor altura de la aleta caudal	Lardner, 2000
<i>Hyla chrysoscelis</i>	náyade de odonato	----	----	----	varios cambios en el cuerpo y cola del renacuajo como así también en la coloración	Richardson, 2007
<i>Hyla femoralis</i>	belostomátido	----	----	Baja		
<i>Hyla versicolor</i>	náyade de odonato	ninguno	ninguno	ninguno	varios cambios	Relyea & Hoverman, 2003
<i>Hyla versicolor</i>	náyade de odonato	----	----	Baja	cuerpo corto y mayor altura de aleta caudal	Schoeppner & Relyea, 2005
<i>Agalychnis callidryas</i>	araña acuática	grande	Largo	----	----	Vonesh & Warkentin, 2006
<i>Agalychnis callidryas</i>	belostomátido	pequeño	Corto	----	----	Vonesh & Warkentin, 2006
<i>Pelobates fuscus</i>	larva de coleóptero	ninguno	ninguno	ninguno	Ninguno	Lardner, 2000
<i>Rana arvalis</i>	náyade de odonato	grande	Largo	----	mayor altura de aleta caudal	Laurila <i>et al.</i> , 2006
<i>Rana arvalis</i>	larva de coleóptero	ninguno	ninguno	ninguno	mayor altura de la aleta caudal	Lardner, 2000
<i>Rana aurora</i>	náyade de odonato	grande	Largo	----	----	Barnett & Richardson, 2002
<i>Rana catesbeiana</i>	náyade de odonato	----	----	Baja	----	Relyea & Werner, 1999
<i>Rana dalmita</i>	larva de coleóptero	pequeño	Largo	Baja	mayor altura de la aleta caudal	Lardner, 2000

---

<i>Rana lessonae</i>	náyade de odonato	grande	Largo			Altwegg, 2000
<i>Rana pretiosa</i>	náyade de odonato	ninguno	ninguno	ninguno	----	Barnett & Richardson, 2002
<i>Rana ridibunda</i>	náyade de odonato	ninguno	Largo	----	mayor altura de la aleta caudal	Van Burskirk & Saxer, 2001
<i>Rana sphenocephala</i>	náyade de odonato	grande*	Largo	ninguno	----	Babbitt, 2001
<i>Rana sylvatica</i>	náyade de odonato	ninguno	Largo	----	varios cambios	Relyea, 2001a
<i>Rana temporaria</i>	náyade de odonato	ninguno	ninguno	----	----	Laurila & Kujasalo, 1999
<i>Rana temporaria</i>	náyade de odonato	grande	Largo	ninguno	----	Laurila <i>et al.</i> , 1998
<i>Rana temporaria</i>	larva de coleóptero	pequeño	ninguno	Baja	mayor altura de la aleta caudal	Lardner, 2000
<i>Rana temporaria</i>	notonéctido	----	----	----	cuerpos cortos y aletas caudales altas	Van Burskirk, 2001a
<i>Rana temporaria</i>	náyades de odonatos	----	----	----		Van Burskirk, 2001a
<i>Discoglossus galganoi</i>	náyade de odonato	pequeño*	Largo	----	----	Nicieza <i>et al.</i> , 2007

---

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN GENERAL

#### *Respuestas del desarrollo y del crecimiento de los anuros frente al hidroperíodo y a la depredación*

La duración del hidroperíodo tiene un efecto sumamente importante sobre la estructura de una comunidad, determinando en gran medida los organismos que pueden establecerse en cada humedal, y regulando sus ciclos de vida. Por ejemplo, en humedales permanentes el hidroperíodo tendrá poco efecto en el ciclo de vida de los organismos presentes, mientras que otros factores como la depredación resultarán más determinantes. Como se ha visto, los humedales de mayor duración albergan comunidades más complejas, ya que su mayor permanencia en el tiempo permite que una mayor variedad de especies pueda completar sus ciclos de vida en estos hábitats (Schneider & Frost, 1996). También, los ambientes temporarios de mayor duración actúan como refugio para muchos invertebrados depredadores, como los insectos acuáticos. Todo esto determina que, en muchos casos, el hidroperíodo y la depredación por invertebrados se constituyan como los dos factores principales que interactúan y modelan los ciclos de vida de los organismos que habitan estos ambientes.

Como se ha discutido en capítulos precedentes, el hidroperíodo y la depredación son dos factores importantes que afectaron el desarrollo larvario de las tres especies de anuros estudiadas. Hemos demostrado que estos factores producen respuestas opuestas en el desarrollo y el crecimiento de los renacuajos de las especies estudiadas de *Pleurodema* y *Rhinella*. El hidroperíodo aceleró tanto el desarrollo como el crecimiento de los renacuajos de *Pleurodema*, mientras que la presencia de depredadores retrasó

ambas variables (Capítulo V). Por su parte, los renacuajos de *Rhinella spinulosa* solo mostraron respuestas del desarrollo frente al hidroperíodo y a la depredación.

Las tres especies de anuros estudiadas están presentes en ambientes acuáticos de distinta duración, desde efímeros hasta permanentes (Úbeda, 1998). Por lo tanto, el hidroperíodo podría resultar un factor determinante en el tiempo de desarrollo de estas especies de anuros. Sin embargo, el tiempo de desarrollo está íntimamente relacionado a la temperatura, variable que es dependiente del hidroperíodo de los humedales. Newman (1992) sugirió que renacuajos que habitan humedales con hidroperíodos muy variables podrían ser más sensibles al incremento de la temperatura que renacuajos de ambientes permanentes o estables. Las respuestas observadas en las especies estudiadas respecto al hidroperíodo, no fueron evaluadas con respecto a la temperatura, pero se podría asumir su relación directa con la variación de temperaturas propias de estos ambientes fluctuantes. El incremento de la temperatura en estos ambientes podría ser también una señal “empleada” por los renacuajos para determinar cuándo acelerar el desarrollo antes de que el humedal se seque.

En el presente trabajo se evaluó de forma independiente el efecto del hidroperíodo y de los depredadores. Pocos trabajos han evaluado la plasticidad del desarrollo de los anuros a través del análisis del efecto combinado del hidroperíodo y de la depredación. En general, se ha observado que el hidroperíodo resulta ser un factor de gran influencia en respuestas como el desarrollo y el crecimiento de los renacuajos, aun en presencia de depredadores (Laurila & Kujasalo, 1999; Lane & Mahony, 2002). Por ejemplo, Laurila & Kujasalo (1999) observaron que tanto el desarrollo como el crecimiento de los renacuajos de *Rana temporaria* criados bajo dos regímenes de hidroperíodo y bajo dos condiciones de depredación, mostraron estar mayormente influenciados por el hidroperíodo. Sin embargo, la presencia de depredadores solo

pareció tener un efecto importante en el crecimiento de los renacuajos bajo un régimen de hidroperíodo estable. Por lo tanto, sería necesario incluir en futuros estudios experimentales la combinación de ambos factores (hidroperíodo y depredadores) para determinar cuál de ellos tiene un mayor efecto sobre el desarrollo y el crecimiento de los anuros estudiados.

En este trabajo se observó que bajo condiciones naturales, los ambientes más efímeros no presentaron depredadores, mientras que los ambientes de mayor hidroperíodo fueron colonizados por diferentes especies de insectos depredadores (Capítulo III). Podríamos concluir entonces que en las especies de anuros estudiados, dependiendo del humedal, las respuestas del desarrollo y del crecimiento estarían condicionadas por uno (hidroperíodo) o por ambos factores (hidroperíodo y depredación).

#### *Respuestas conductuales y respuestas morfológicas en presencia de depredadores*

Se ha observado que los anfibios, al igual que otros organismos, presentan una variedad de respuestas conductuales y morfológicas para mitigar los efectos negativos de la depredación (Skelly & Werner, 1990; Hopper, 2001; Relyea, 2001a; Boeing, 2002; Johansson, 2002; Vonesh, 2003; Benard, 2004; Kishida & Nishimura, 2005). Los resultados de nuestros estudios indicaron que los renacuajos modifican tanto el comportamiento (reducen su actividad) como la morfología (generalmente presentan aletas y cuerpos más altos) en presencia de depredadores y también se observó que, estas respuestas están relacionadas con el grado de palatabilidad de las especies estudiadas.

Las respuestas morfológicas y de comportamiento observadas en este estudio mostraron diferencias que podrían estar asociadas al tiempo en que tardan en expresarse



y a los costos que conllevan. El tiempo transcurrido entre la percepción de un cambio en el ambiente y la traducción en un cambio de la conducta del individuo puede ser relativamente corto con respecto a otras respuestas (DeWitt *et al.*, 1998). Las respuestas conductuales, por ejemplo, se reconocen como respuestas antidepredatorias que se expresan más rápidamente y muchos autores las han descrito como altamente reversibles (West-Eberhard, 1989). Existen ejemplos de cambios en el comportamiento de los renacuajos expuestos a sus depredadores que se expresan rápidamente (West-Eberhard, 1989; Chivers & Smith, 1998; Relyea, 2003). En nuestro estudio, los cambios observados en la actividad de los renacuajos expuestos a depredadores fueron detectados al menos después de 30 minutos de la exposición, tiempo que establecimos necesario para eliminar los posibles efectos del estrés provocado por la manipulación necesaria en la preparación de los experimentos. Será necesario en el futuro diseñar protocolos experimentales para medir el tiempo mínimo en que estas respuestas comportamentales se expresan.

Se ha observado que la sola presencia de señales químicas del depredador (cairomonas) es suficiente para producir un cambio en el comportamiento de los renacuajos (Stauffer & Semlitsch, 1993). En el presente estudio, la respuesta comportamental de los renacuajos (reducción de la actividad) se desencadenó al exponerlos a una combinación tanto de señales químicas (cairomonas) como visuales del depredador. Muchos autores han observado que otras señales derivadas de los depredadores, como las señales visuales y las táctiles, tienen un menor efecto sobre la actividad de los renacuajos que las señales químicas (Stauffer & Semlitsch, 1993; Kiesecker *et al.*, 1996). En este trabajo la disminución de la actividad de los renacuajos en respuesta a la presencia de los diferentes insectos depredadores, podría atribuirse en primera instancia a la detección de las señales químicas liberadas al agua por el

depredador. Nuestro objetivo no fue evaluar la importancia de una u otra señal por lo que en los experimentos los renacuajos podrían percibir las diferentes señales (química, visual y táctil), por lo tanto no podemos separar cuanto contribuye cada una de ellas en la respuesta de estos renacuajos.

Las respuestas morfológicas frente a la presencia de depredadores han sido propuestas como respuestas a largo plazo, poco reversibles o incluso incapaces de revertirse (West-Eberhard, 1989). Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que en algunas especies de anuros los cambios morfológicos pueden expresarse en lapsos cortos de tiempo y que pueden resultar reversibles (Relyea, 2003; Kishida & Nishimura, 2006). La reversibilidad de las respuestas plásticas puede ser dependiente del estadio ontogenético en el cual la respuesta es inducida. Por ejemplo, la reversibilidad de caracteres morfológicos inducidos en renacuajos por la presencia de depredadores decrece con el transcurso del desarrollo (Relyea, 2003). También se ha observado en anfibios que la plasticidad morfológica podría mantenerse casi a lo largo de todo el desarrollo ontogenético del individuo, presumiblemente por las fluctuaciones temporales en los regímenes de depredación de los ambientes donde viven las presas (Kishida & Nishimura, 2006). En los ambientes aquí estudiados se ha observado que a lo largo del desarrollo larval de *Pleurodema* y *Rhinella* los ambientes cambian mes a mes en la composición de depredadores insectos, como así también en sus abundancias relativas. Tanto los resultados obtenidos experimentalmente sobre las respuestas de estas especies de anuros a los depredadores, como los datos cuantitativos de fenología y abundancia de depredadores en sus ambientes naturales nos indicarían que, bajo estos regímenes de depredación las especies podrían expresar altos niveles de plasticidad en las variables respuesta estudiadas (actividad, morfología) durante gran parte del período de desarrollo .

Para interpretar la presencia de las defensas o respuestas específicas desde un punto de vista evolutivo, es necesario interpretar cómo está actuando la selección sobre una característica. Arnold (1983) propuso la idea de cómo puede evaluarse si un carácter resulta adaptativo y si puede actuar la selección sobre el mismo (denominado el paradigma “Morphology, performance and fitness”). Para ello, es posible establecer si el carácter medido (*i.e.* morfológico) tiene implicancia positiva en el “fitness” o eficacia biológica. Por lo tanto, la selección puede analizarse en dos partes: i) el gradiente de rendimiento (“performance gradient”), que estará representado por el efecto de un carácter o rasgo sobre algún aspecto del rendimiento (*i.e.* habilidad de nadar más rápido) y 2) el gradiente de la eficacia (“fitness gradient”), es decir el efecto del rendimiento sobre la eficacia de dicho carácter (*i.e.* supervivencia). Por otro lado el desarrollo de experimentos de selección (como los experimentos de depredación directa) aporta información sobre el valor adaptativo de una defensa, y la dirección de las presiones selectivas que modelan esta defensa.

Muchos autores han trabajado sobre dicho paradigma y han demostrado, por ejemplo, que los cambios en la conducta y en la morfología de algunas presas aumentan su supervivencia (“fitness”) a través de diferentes mecanismos (Skelly, 1997; Van Buskirk *et al.*, 2003; Teplitsky *et al.*, 2005). Skelly (1997) demostró que renacuajos menos activos son menos depredados que renacuajos más activos cuando son expuestos a náyades de odonatos, debido a una menor frecuencia de encuentro presa-depredador. Además, los renacuajos son menos detectables para depredadores con estrategias de tipo visual y táctil, como los insectos acuáticos. Los cambios morfológicos por su lado actúan indirectamente sobre el aumento de la supervivencia de los renacuajos. En general, a través de estudios morfo-funcionales se ha observado que los renacuajos que presentan morfologías inducidas por presencia de depredadores poseen un mejor

desempeño o “performance” en la natación que los renacuajos no inducidos (McCollum & Leimberger, 1997). El aumento de la longitud de la cola y de la altura de las aletas, como así también el mayor desarrollo de la musculatura caudal en renacuajos inducidos, incrementa su velocidad de natación y les permite evadir más fácilmente a sus depredadores, y de esta manera incrementa su supervivencia (Caldwell *et al.*, 1980; Lawler, 1989; Azevedo-Ramos *et al.*, 1992; Teplitsky *et al.*, 2005). Nuestros resultados de los experimentos de depredación directa de renacuajos inducidos y no inducidos en *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* mostraron que los renacuajos inducidos presentaron una mayor supervivencia cuando fueron expuestos a náyades de odonatos. En *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* este incremento en la supervivencia no habría estado relacionado con un aumento en el desempeño de la natación de los renacuajos inducidos, ya que las velocidades de natación no difirieron significativamente de los morfotipos de renacuajos no inducidos. Otros factores podrían estar actuando en el incremento observado en la supervivencia de estas especies, por ejemplo, la reducción en la actividad y/o el fenómeno de distracción o “lure effect” (Van Buskirk *et al.*, 2003).

En este trabajo hemos determinado que los renacuajos de la especie *Rhinella spinulosa* resultaron ser no palatables a los depredadores en un período vital de su ontogenia, mientras que no se detectaron indicios de inpalatabilidad en los renacuajos de las especies de *Pleurodema*. Los renacuajos de *R. spinulosa* mostraron una variación en su grado de palatabilidad a lo largo de la ontogenia, dado por la presencia de sustancias no palatables en estadios tempranos del renacuajo, rasgo común observado en los bufónidos (Wassersug, 1973). Además, los renacuajos de esta especie presentaron una baja sensibilidad a la presencia de insectos depredadores, evidenciada por la ausencia de respuesta comportamental en estadios no-palatables frente a los diferentes depredadores. Sin embargo, se comprobó que modificaron sus niveles de actividad en

estadios intermedios del desarrollo (estadios palatables), principalmente cuando fueron expuestos a un tipo particular de depredador como las náyades del odonato *Rhionaeschna variegata*. Por otro lado, la morfología no evidenció modificaciones cuando fueron expuestos a estos depredadores. Estos resultados sugieren que la presencia de defensas constitutivas como las toxinas responsables de la no-palatabilidad contrarrestaría el costo energético que implica la expresión de otras posibles defensas antidepredatorias (conducta y morfología). Sin embargo la eficiencia de la no-palatabilidad depende de la composición de los depredadores presentes en el ambiente, como así también la presencia de presas alternativas más palatables (Gunzburger & Travis, 2005).

#### *Consecuencias ecológicas de la plasticidad*

Las consecuencias de la plasticidad fenotípica sobre la ecología de los organismos pueden ser profundas. En general, el foco de interés ha sido sobre el estudio de los patrones de expresión de las respuestas plásticas de los organismos y su evolución a través de selección natural, más que conocer cómo estos patrones de cambio afectan patrones y procesos ecológicos. Sin embargo, desde hace unos años existe un creciente interés sobre cómo la plasticidad altera los patrones ecológicos y ha comenzado a desarrollarse el estudio del efecto de la plasticidad sobre los ecosistemas a diferentes niveles (Miner *et al.*, 2005). La presencia en una comunidad de organismos que muestran plasticidad fenotípica puede afectar muchos procesos ecológicos que alteren la dinámica y el funcionamiento del ecosistema. El efecto de los organismos plásticos sobre diferentes procesos ecológicos puede advertirse al tener en cuenta que la plasticidad es producto de una variedad de interacciones, como por ejemplo la competencia y la depredación entre organismos del ecosistema y la interacción de estos

organismos con factores abióticos del ambiente como temperatura, hidroperíodo, etc. La alteración del fenotipo de un organismo producto de dichas interacciones podría afectar las subsecuentes interacciones de este organismo con su medio y con el resto de los organismos. Un ejemplo de esto fue brindado por Kishida *et al.* (2006), quienes observaron que a partir de una interacción depredador-presa entre una salamandra y un anuro, ambos modificaban sus fenotipos. En presencia de una larva de salamandra *Hynobius retardatus*, los renacuajos de *Rana pirica* presentaron cuerpos más globosos, característica ventajosa que aumentaba su supervivencia frente a este depredador (Kishida & Nishimura, 2004). Estos autores observaron también que en presencia de renacuajos más globosos, las salamandras modificaron su fenotipo aumentando el tamaño de la boca pudiendo de esta manera consumir renacuajos cada vez más globosos. Como las salamandras son depredadores del tipo “gape-limited” el aumento del tamaño de su boca inducido por la presencia de renacuajos más globosos no solo le permitió capturar presas mayores sino que aumentó su espectro de presas potenciales, con un posible efecto a nivel de toda la comunidad de presas.

En este estudio se determinó que variables ambientales como el hidroperíodo y variables biológicas como la depredación, afectan rasgos de la historia de vida, morfológicos y del comportamiento de los renacuajos de tres especies de anuros. En particular, en las interacciones con los depredadores se observó una respuesta muy marcada en las especies de *Pleurodema*, que modificaron su comportamiento y su morfología en presencia de los depredadores. Las respuestas fueron variables, dependiendo de las tallas de los renacuajos y del tipo de depredador. Estas respuestas plásticas podrían modificar las interacciones con otros miembros de la comunidad, como por ejemplo la competencia entre renacuajos y otros herbívoros de la cadena trófica. De la misma manera, el arribo de nuevos depredadores al ambiente modificará

la relación entre presas y depredadores establecidos más tempranamente. Por lo tanto las relaciones de depredación y de competencia entre los niveles de las redes tróficas no solo afectarán de manera individual a los anfibios, sino también, de manera indirecta a la comunidad en su conjunto (Miner *et al.*, 2005). Por ejemplo, la reducción de la actividad observada en los renacuajos expuestos a depredadores, podría tener efectos a lo largo de toda la cadena trófica de los humedales estudiados. Asumiendo que una reducción en la actividad del renacuajo en presencia de depredadores implica una reducción en la actividad de forrajeo, es posible predecir que la presión de herbivoría disminuirá sobre la comunidad del perifiton y del fitoplancton.

Loman (2001) encontró que los renacuajos en altas densidades pueden tener un fuerte efecto sobre la comunidad algal. Por lo tanto la disminución de la herbivoría por los renacuajos sobre el fitoplancton y el perifiton podría tener implicancias tanto a nivel de la estructura como de la composición del mismo. La disminución de la actividad de alimentación de los renacuajos podría además disminuir la competencia entre éstos y otros herbívoros y detritívoros presentes en los humedales estudiados, como por ejemplo cladóceros y caracoles.

Otro aspecto que se plantea sobre las interacciones de larvas de anfibios y depredadores es cuando en el ambiente se encuentran múltiples depredadores. Los anfibios durante su etapa larvaria, así como otros organismos acuáticos, están sometidos a una intensa presión de depredación ejercida por la presencia de múltiples depredadores (Sih, 1987; Sih *et al.*, 1998; Vonesh, 2003; Vonesh & Osenberg, 2003), que pueden interactuar directa o indirectamente en los patrones de supervivencia de los anuros (Sih, 1987). Por ejemplo, los embriones de algunas especies de anuros eclosionan tempranamente y a un tamaño menor cuando son expuestos a la presencia de depredadores de huevos y embriones (Moore *et al.*, 1996; Warkentin, 2000; Chivers *et*

*al.*, 2001; Vonesh, 2003). Estos renacuajos “prematurados” experimentarán una alta mortalidad dada por depredadores de renacuajos como las náyades de odonatos (Vonesh & Osenberg, 2003), por lo que estas respuestas plásticas podrían tener consecuencias negativas en posteriores etapas del desarrollo, ya que renacuajos más pequeños serán presas más accesibles a otro tipo de depredadores presentes en los ambientes.

Por otro lado, la plasticidad puede generar modificaciones en las interacciones de manera indirecta, a través de un mecanismo denominado interacciones indirectas mediadas por un rasgo o característica (“trait-mediated indirect interactions”) (Peacor & Werner, 2000; Werner & Peacor, 2003; Miner *et al.*, 2005). Se ha observado que las respuestas de las presas a sus depredadores, como por ejemplo reducción en la actividad, tienen grandes efectos en la dinámica de las cadenas tróficas tanto terrestres como acuáticas (Beckerman *et al.*, 1997; Miner *et al.*, 2005). Los sistemas con múltiples depredadores presentan una estratificación de los mismos dada por su importancia del efecto que producen sobre la comunidad. Por ejemplo, en sistemas acuáticos con depredadores peces e invertebrados, los peces son considerados los depredadores tope ya que son voraces depredadores de anfibios e invertebrados (Eklöv, 2000; Eklöv & Werner, 2000). En nuestro estudio, donde los ambientes acuáticos solo presentan depredadores invertebrados, las náyades de odonatos ocuparían el rol de depredadores tope dentro de la cadena trófica ya que hemos observado que las náyades de *Rhionaeschna variegata* depredan tanto sobre otros invertebrados (larvas de coleópteros y notonéctidos) como sobre larvas de anfibios (Jara, obs. pers.). Se ha visto que la presencia de un depredador tope puede reducir la actividad de forrajeo de un depredador menor, e indirectamente disminuir la mortalidad de sus presas (Eklöv, 2000). En nuestro estudio la presencia de náyades de *R. variegata* podría afectar la actividad de



alimentación de estos pequeños depredadores y de esta manera reducir la mortalidad que éstos ejercen sobre los renacuajos de menor tamaño.

*Características plásticas de la historia de vida, comportamiento y morfología de los anuros y su relación con la estructura de las comunidades en humedales temporarios.*

Wellborn *et al.* (1996) propusieron un modelo en el que se representa a las comunidades acuáticas de agua dulce a lo largo de un gradiente constituido por la permanencia de los humedales y la composición de los depredadores. En este modelo se introducen diferentes variables físicas de los humedales, así como características propias de los organismos (comportamiento y morfología, entre otros) y a su vez las relaciones interespecíficas (competencia y depredación). Las variables físicas de los humedales determinan las potenciales especies que podrían habitar un determinado ambiente, mientras que son las interacciones entre las especies las que determinan la composición real de cada comunidad. Las tres especies de anuros en los humedales estudiados en este trabajo utilizan humedales temporarios para reproducirse y desarrollarse. Sin embargo los humedales que colonizan, aun siendo temporarios pueden diferir ampliamente en la duración de su hidropériodo, pudiéndose ubicar estos dentro de un gradiente de hidropériodo señalado en el modelo de Wellborn *et al.* (*op. cit.*). Su duración excluye ciertos grupos de organismos, como los peces que se encuentran en uno de los extremos del gradiente de Wellborn, produciendo grandes cambios en las cadenas tróficas de los ambientes que los presentan. Por otro lado, dependiendo de las precipitaciones anuales el hidropériodo de estos humedales puede variar año a año siendo mas corto o más largo, y en algunos casos mantenerse con agua durante todo el año (Laguna Fantasma). Los años secos no solo reducen la extensión del hidropériodo si no también la densidad

de depredadores (Werner *et al.*, 2009). Esto hace posible que la composición de depredadores como así también de otros grupos funcionales (pastoreadores y detritívoros) fluctúe interanualmente aun dentro de un mismo humedal. Por ejemplo, en la laguna Fantasma dependiendo del año puede o no haber náyades de odonatos, lo que determina una fluctuación en el riesgo de depredación. Este riesgo también varía por características intrínsecas de los depredadores que colonizan los ambientes como su comportamiento de depredación y formas de alimentación. Dentro de la comunidad de depredadores podemos reconocer tres grupos de insectos según el comportamiento de depredación: i- cazadores al acecho como belostomátidos, ii- cazadores activos como notonéctidos, y iii- aquellos que presentan un comportamiento mixto como náyades de odonatos y larvas de ditíscidos. Según las formas de alimentación tendríamos dos grupos bien diferentes: i- masticadores como náyades de odonatos y ii- suctopícoros como notonéctidos, belostomátidos y larvas de ditíscidos. Estas características de los depredadores determinan que la susceptibilidad de los anuros a la depredación sea variable entre especies y entre tamaños de renacuajos, determinando diferentes presiones selectivas que influyen sobre el desarrollo de respuestas plásticas específicas en diferentes etapas de la ontogenia.

Además de lo que ocurre con estas variables bióticas, las precipitaciones anuales determinan también las variables abióticas como la temperatura. Por ejemplo, en años de sequía, se predice un incremento de las temperaturas de los humedales acompañadas de una rápida reducción de las áreas de los mismos. Todo esto desarrolla un terreno propicio para el desarrollo de diferentes respuestas plásticas de los organismos, que les permita sortear las presiones impuestas por la heterogeneidad ambiental. Como se ha demostrado en esta tesis las especies de anuros estudiadas presentan plasticidad en diferentes aspectos de su historia de vida y dicha plasticidad varía entre especies.

Podríamos concluir que *Pleurodema thaul* es una especie que se encuentra en ambientes de mayor hidroperíodo, mientras que *P. bufoninum* y *Rhinella spinulosa* ocurren en ambientes más efímeros. Esto podría determinar que la mayor variedad de respuestas plásticas observadas en *P. thaul* podrían estar determinadas mayormente por el riesgo a la depredación, ya que ocupan en el modelo gradiente hidroperíodo-depredadores los hábitats con mayor permanencia y más riesgosos en cuanto a la presencia y diversidad de depredadores. Por el contrario, *Pleurodema bufoninum* y *Rhinella spinulosa* se encuentran en ambientes representados en el otro extremo del gradiente, en ambientes más efímeros, pudiendo determinar que las respuestas plásticas observadas estén más asociadas al hidroperíodo que a la depredación.

Los sistemas estudiados brindan un modelo ideal para futuros estudios cuyos objetivos son dilucidar diferentes aspectos de las consecuencias de la plasticidad sobre el desarrollo y evolución de las comunidades. Muchos de estos ambientes son únicos en cuanto a sus características ambientales, como por ejemplo los mallines o pastizales de inundación, típicos de la Patagonia. Estos ambientes presentan una diversidad particular de especies, tanto de invertebrados como de vertebrados, siendo los anfibios los únicos vertebrados acuáticos presentes en estas comunidades. Además, albergan muchas especies endémicas de zooplancton, insectos y anuros, por lo que futuros estudios sobre las interacciones de los anfibios con el resto de los organismos que conforman la comunidad, ayudarán a tener un conocimiento más acabado acerca de los procesos que llevan al funcionamiento de estos ecosistemas.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Adityaa G, Ashb A & Sahaa GK (2006) Predatory activity of *Rhantus sikkimensis* and larvae of *Toxorhynchites splendens* on mosquito larvae in Darjeeling, India. J. Vect. Borne. Dis. 43: 66-72.
- Agrawal AA (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. Science 294: 321-326.
- Alford RA (1999) Ecology: resource use, competition, and predation. In: McDiarmid RW, Altig R, eds. Tadpoles. Chicago, IL: University of Chicago Press, 240-278.
- Allan JD, Flecker AS & McClintock NL (1987) Prey size selection by carnivorous stoneflies. Limnol. Oceanogr. 32: 864-872.
- Altwegg R (2002) Predator-induced life-history plasticity under time constraints in pool frogs. Ecology 83: 2542-2551.
- Altwegg R & Reyer HU (2003) Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. Evolution 57: 872-882.
- Álvarez D & Nicieza AG (2002) Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. Oecologia 131: 186-195.
- Álvarez D & Nicieza AG (2006) Factors determining tadpole vulnerability to predators: can prior experience compensate for a suboptimal shape? Evol. Ecol. 20: 523-534.
- Anderson TA, Kiesecher JM, Chivers DP & Blaustein AR (2001) The direct and indirect effects of temperature on a predator-prey relationship. Can. J. Zool. 79: 1834-1841.
- Anholt BR & Werner EE (1995) Interaction between food availability and predation mortality mediated by activity. Ecology 76: 2235-2239.

- Anholt BR, Skelly DK & Werner EE (1996) Factors modifying antipredator behaviour in larval toads. *Herpetologica* 52: 301-313.
- Armúa De Reyes C & Estévez AL (2005) Diversidad de Heterópteros acuáticos, con especial referencia a las *Belostoma* (Heteróptera: Belostomatidae). *INSUGEO Miscelánea* 14: 281-292.
- Arnold SJ (1983) Morphology, performance and fitness. *Amer. Zool.* 23: 347-361.
- Arnold JS & Wassersug RJ (1978) Differential predation on metamorphic anurans by garter snakes (*Thamnophis*): Social behavior as a possible defense. *Ecology* 59: 1014-1022.
- Atkinson D (1996) Ectotherm life-history responses to developmental temperature. *Animals and Temperature. Phenotypic and Evolutionary Adaptation*: 183-204 (Johnston IA & Benett AF, Eds.). Cambridge Univ. Press.
- Auld JR, Agrawal AA & Relyea RA (2010) Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proc. R. Soc. B* 277: 503-511.
- Azevedo-Ramos C, Van Sluys M, Hero J-M & Magnusson WE (1992) Influence of tadpole movement on predation by odonate naiads. *J. Herpetol.* 26: 335-338.
- Azevedo-Ramos C, Magnusson W E & Bayliss P (1999) Predation as the key factor structuring tadpole assemblages in a savanna area in central Amazonia. *Copeia* 1999: 22-33.
- Bachmann AO (1963) Apuntes para una hidrobiología argentina. VI. Los Hemiptera Cryptocerata de la Patagonia extracordillerana. *Physis* 24 (67): 35-37.
- Babbitt KJ (2001) Behaviour and growth of southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*) tadpoles: effects of food and predation risk. *Can. J. Zool.* 79: 809-14.

- Babbitt K & Jordan F (1996) Predation on *Bufo terrestris* tadpoles: effects of cover and predator identity. *Copeia* 1996: 485-488.
- Barnett HK & Richardson JS (2002) Predation risk and competition effects on the life-history characteristics of larval Oregon spotted frog and larval red-legged frog. *Oecologia* 132: 436-444.
- Beckerman AP, Uriarte M & Schmitz OJ (1997) Experimental evidence for a behavior-mediated trophic cascade in a terrestrial food chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10735-10738.
- Begon M, Townsend CR & Harper JL (2006) *Ecology: From individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd.
- Beiswenger RE (1975) Structure and function in aggregations of tadpoles of the American toad, *Bufo americanus*. *Herpetologica* 31: 222-233.
- Beiswenger RE (1977) Diel patterns of aggregative behavior in tadpoles of *Bufo americanus*, in relation to light and temperature. *Ecology* 58: 98-108.
- Beiswenger RE (1981) Predation by gray jays on aggregating tadpoles of the boreal toad (*Bufo boreas*). *Copeia* 1981: 459-460.
- Benard MF (2004) Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 35: 651-73.
- Benard MF & Fordyce JA (2003) Are induced defenses costly? Consequences of predator-induced defenses in western toads, *Bufo boreas*. *Ecology* 84: 68-78.
- Berven KA (1981) Mate choice in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Evolution* 35: 707-722.
- Berven KA & Gill DE (1983) Interpreting geographic variation in lifehistory traits. *Integrat. Comp. Biol.* 23: 85-97.

- Berven KA (1990) Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology* 71: 1599-1608.
- Blanckenhorn WU (1998) Adaptive phenotypic plasticity in growth, development, and body size in the yellow dung fly. *Evolution* 52: 1394-1407.
- Blaustein L (1990) Evidence for predatory flatworms as organizers of zooplankton and mosquito community structure in rice fields. *Hydrobiol.* 199: 179-191.
- Blaustein L & Dumont HJ (1990) Typhloplanid flatworms (*Mesostoma* and related genera): mechanisms of predation and evidence that they structure aquatic invertebrate communities. *Hydrobiol.* 198: 61-77.
- Blaustein L, Kotler BP & Ward D (1995) Direct and indirect effects of a predatory backswimmer (*Notonecta maculata*) on community structure of desert temporary pools. *Ecol. Entomol.* 20: 311-318.
- Boeing WJ (2002) Costs and benefits of *Daphnia* antipredator behavior and consequences on community stability. A dissertation thesis requirement for the degree of Doctor of Philosophy. Louisiana State University (USA), 148 pp.
- Bookstein FL (1991) Morphometric tools for landmark data. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Both C, Solé M, Gomes dos Santos T & Cechin SZ (2009) The role of spatial and temporal descriptors for neotropical tadpole communities in southern Brazil. *Hidrobiol.* 624: 125-138.
- Bradshaw WE & Johnson K (1995) Initiation of metamorphosis in the pitcher-plant mosquito: effects of larval growth history. *Ecology* 76: 2055-2065.
- Brady LD & Griffiths RA (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.

- Brendonck L, Michels E, De Meester L & Riddoch B (2002) Temporary pools are not 'enemy-free'. *Hydrobiol.* 486: 147-159.
- Brockhurts MA, Rainey PB & Buckling A (2004) The effect of spatial heterogeneity and parasites on the evolution of host diversity. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271: 107-111.
- Brodie ED Jr & Formanowicz DR Jr (1983) Prey size preference of predators: differential vulnerability of larval anurans. *Herpetologica* 39: 67-75.
- Brodie ED & Formanowicz DR Jr (1987) Antipredator mechanisms of larval anurans: protection of palatable individuals. *Herpetologica* 43: 369-373.
- Brodie ED JR, Formanowicz DR JR & Brodie ED III (1978) The development of noxiousness of *Bufo americanus* tadpoles to aquatic insect predators. *Herpetologica* 34: 302-306.
- Brönmark C & Hansson L-A (2000) Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos* 88: 103-109.
- Caldwell JP, Thorp JH & Jervey TO (1980) Predator-prey relationships among larval dragonflies, salamanders, and frogs. *Oecologia* 46: 285-289.
- Calef GW (1973) Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. *Ecology* 54: 741-758.
- Casanovas P & Úbeda CA (2006) *Alsodes gargola*. Predation. *Herpetol. Rev.* 37: 439-440.
- Chaparro CI (2009) Respuestas adaptativas a la exposición a la radiación ultravioleta en anfibios: el rol de la mecanización como factor de fotoprotección. Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue, 89 pp.
- Chivers DP & Smith RFJ (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience* 5: 338-352.



- Chivers DP, Kiesecker JM, Maro A, DeVito J & Blaustein AR (2001) Predator-induced life history changes in amphibians: egg predation induced hatching. *Oikos* 92: 135-142.
- Chivers DP, Kiesecker JM, Marco A, Wildy EL, Blaustein AR (1999) Shifts in life history as a response to predation in western toads (*Bufo boreas*). *J. Chem. Ecol.* 25: 2455-2463.
- Conover WJ (1980) *Practical Nonparametric Statistics*, Second Edition, John Wiley and Sons, New York .
- Cronin JT & Travis J (1986) Size-limited predation on larval *Rana areolata* (Anura: Ranidae) by two species of backswimmer (Insecta: Hemiptera: Notonectidae). *Herpetologica* 42: 171-174.
- Crowl TA & Covich AP (1990) Predator-induced life history shifts in a freshwater snail. *Science* 247: 949-951.
- Crump ML (1984) Ontogenetic changes in vulnerability to predation in tadpoles of *Hyla pseudopuma*. *Herpetologica* 40: 265-271.
- Crump ML (1989) Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. *Copeia* 1989: 794-797.
- Crump ML & Vaira M (1991) Vulnerability of *Pleurodema borelli* tadpoles to an avian predator. Effect of body size and density. *Herpetologica* 47: 316-321.
- Cuello ME, Jara FG & Vidoz Q (2005) *Atelognathus patagonicus*. Predation. *Herpetol. Rev.* 36: 298.
- Danner BJ & Joern A (2003) Resource-mediated impact of spider predation risk on performance in the grasshopper *Ageneotettix deorum* (Orthoptera: Acrididae). *Oecologia* 137: 352-359.

- Dayton GH & Fitzgerald LA (2001) Competition, predation, and the distribution of four desert anurans. *Oecologia* 129: 430-435.
- Dayton GH, Saenz D, Baum KA, Langerhans RB & DeWitt TJ (2005) Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos* 111: 582-591.
- Denton J & Beebee TJC (1991) Palatability of anuran eggs and embryos. *Amphibia-Reptilia* 12: 111-114.
- Denver RJ, Mirhadi N & Phillips M (1998b) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondii* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79: 1859-1872.
- Denver RJ (1997a) Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Horm. Behav.* 31: 169-179.
- Denver RJ (1997b) Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Am. Zool.* 37: 172-184.
- Denver RJ, Mirhadi N & Phillips M (1998a) An experimental analysis of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis: developmental response of *Scaphiopus hammondii* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology* 79: 1859-1872.
- Desai M & Hales CN (1997) Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol. Rev.* 72: 329-342.
- De Jong G (1995) Phenotypic plasticity as a product of selection in a variable environment. *Am. Nat.* 145: 493-512.
- DeWitt TJ, Sih A & Wilson DS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* 13: 77-81.

- DeWitt TJ, Sih A & Hucko JA (1999) Trait compensation and cospecialization in a freshwater snail: size, shape and antipredator behaviour. *Anim. Behav.* 58: 397-407.
- DeWitt T & Langerhans RB (2004) Integrated solutions to environmental heterogeneity: theory of multimoment reaction norms. In *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches* (DeWitt TJ & Scheiner SM eds.), pp. 98-111. Oxford: Oxford University Press.
- Dmitriew C & Rowe L (2005) Resource limitation, predation risk and compensatory growth in a damselfly. *Oecologia* 142: 150-154.
- Dominguez E & Fernández HR (2009) *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Downes SJ & Shine R (1999) Do incubation-induced changes in a lizard's phenotype influence its vulnerability to predators? *Oecologia* 120: 9-18.
- Dujardín JP (2000) *Introducción a la morfometría con énfasis en Triatominae y Phlebotominae*. IRD (Institut de Recherches pour le Développement, Paris, France).
- Eklöv P (2000) Chemical cues from multiple predator-prey interactions induce changes in behavior and growth of anuran larvae. *Oecologia* 123: 192-199.
- Eklöv P & Werner EE (2000) Multiple predator effects on size-dependent behavior and mortality of two species of anuran larvae. *Oikos* 88: 250-258.
- Eterovick PC & Sazima I (1999) Description of tadpole of *Bufo rufus* with notes on aggregative behavior. *J. Herpetol.* 33: 711-713.

- Eterovick PC & Sazima I (2000) Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: effects of seasonality, habitat and predation. *Amphibia-Reptilia* 21: 439-461.
- Feminella JW & Hawkins CP (1994) Tailed frog tadpoles differentially alter their feeding behavior in response to non-visual cues from four predators. *J. North Amer. Bent. Soc.* 13: 310-320.
- Fordyce JA (2006) The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* 209: 2377-2383.
- Formanowicz DR Jr & Brodie ED Jr (1982) Relative palatabilities of members of larval amphibian community. *Copeia* 1982: 91-97.
- Formanowicz DR, Stewart MM, Townsend K, Pough FH & Brussard PF (1981) Predation by giant crab spiders on the Puerto Rican frog *Eleutherodactylus coqui*. *Herpetologica* 37: 125-129.
- Formanowicz DR Jr (1986) Anuran tadpole/aquatic insect predator-prey interactions: tadpole size and predator capture success. *Herpetologica* 42: 367-373.
- Frisch D (2002) Dormancy, dispersal and the survival of cyclopoid copepods (Cyclopoida, Copepoda) in a lowland floodplain. *Freshwater Biol.* 47: 1269-1281.
- Frisch D & Santer B (2004) Temperature-induced responses of a permanent-pond and a temporary-pond cyclopoid copepod: a link to habitat predictability? *Evol. Ecol. Res.* 6: 541-553.
- Gervasi SS & Foufopoulos J (2008) Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Funct. Ecol.* 22: 100-108.

- Giller PS (1986) The natural diet of the Notonectidae: field trials using electrophoresis. *Ecol. Entomol.* 11: 163-172.
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos on 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. *J. Evol. Biol.* 11: 21-39.
- Graham TB (1994) Predation by dipteran larvae on fairy shrimp (Crustacea: Anostraca) in Utah rock-pools. *S. Nat.* 39: 206-207.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE & Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 299: 1-262.
- Griffiths RA, Schley L, Sharp PE, Dennis JL & Román A (1998) Behavioural responses of mallorcan midwife toad tadpoles to natural and unnatural snake predators. *Anim. Behav.* 55: 207-214.
- Grilli MP & Estallo E (2006) Variabilidad de la forma corporal en poblaciones de *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: Delphacidae) a escala subregional. *Ecol. Austral* 16: 125-134.
- Gunzburger MS & Travis J (2005) Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *J. Herpetol.* 39: 547-571.
- Harkey GA & Semlitsch RD (1988) Effects of temperature on growth, development, and color polymorphism in the ornate chorus frog *Pseudacris ornata*. *Copeia* 1988: 1001-1007.

- Heilin AM & Herberstein ME (2004) Predator-prey coevolution: Australian native bees avoid their spider predators. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 271: 196-198.
- Henrickson BI (1990) Predation on amphibian eggs and tadpoles by common predators in acidified lakes. *Holarctic Ecol.* 13: 201-206.
- Henschel BT (1999) Complex life cycles in a variable environment: predicting when the timing of metamorphosis shifts from resource dependent to developmentally fixed. *Am. Nat.* 154: 549-558.
- Henschel BT & Emler RB (2000) Metamorphosis of barnacle nauplii: effects of food variability and a comparison with amphibian models. *Ecology* 81: 3495-3508.
- Herwig BR & Schindler DE (1996) Effects of aquatic insect predators on zooplankton in fishless ponds. *Hydrobiol.* 324: 141-147.
- Hews DK (1988) Alarm response in larval western toads, *Bufo boreas*: release of larval chemicals by a natural predator and its effect on natural capture efficiency. *Anim. Behav.* 36: 125-133.
- Hews DK & Blaustein AR (1985) An investigation of the alarm response in *Bufo boreas* and *Rana cascadae* tadpoles. *Behav. Neural Biol.* 43: 47-57.
- Heyer WR, McDiarmid RW & Weigmann DL (1975) Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica* 7: 100-111.
- Hopper KR (2001) Flexible antipredator behaviour in a dragonfly species that coexists with different predator types. *Oikos* 93: 470-476.
- Howard RD (1980) Mating behavior and mating success in wood frogs, *Rana sylvatica*. *Anim. Behav.* 28: 705-716.
- Iriondo M (1989) Quaternary lakes of Argentina. *Paleogeogr., Paleoclim., Paleoecol.* 70: 81-88.

- Jannot JE, Wissinger SA & Lucas JR (2008) Diet and a developmental time constraint alter life-history trade-offs in a caddis fly (Trichoptera: Limnephilidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 95: 495-504.
- Jara FG (2002) Aspectos ecológicos y comportamentales en larvas de dos anuros Patagónicos: *Pleurodema bufoninum* (Leptodactylidae) y *Bufo spinulosus papillosus* (Bufonidae). Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue, 109 pp.
- Jara FG (2008a) Differential vulnerability of *Physalaemus pustulosus* tadpole size classes to predation by the water spider *Thaumasia* sp. (Physauridae). *Amphibia-Reptilia* 29: 432-437.
- Jara FG (2008b) Tadpole-odonate larvae interactions: influence of body size and diel rhythm. *Aquat. Ecol.* 42: 503-509.
- Jara FG & Perotti MG (2004) *Bufo spinulosus papillosus* and *Pleurodema bufoninum*, Predation. *Herpetol. Rev.* 35:162.
- Jara FG & Perotti MG (2006) Variación ontogenética en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus* Philippi, 1902 (Anura, Bufonidae). *Cuad. Herpetol.* 19: 37-42.
- Jara FG & Perotti MG (2009) Toad tadpole responses to predator risk: Ontogenetic change between constitutive and inducible defenses. *J. Herpetol.* 43: 82-88.
- Jara FG, Lozada M & Úbeda CA (2006) *Bufo spinulosus papillosus* tadpole behavior. *Herpetol. Rev.* 37: 201.
- Johansson F (2002) Reaction norms and production costs of predator-induced morphological defences in a larval dragonfly (*Leucorrhinia dubia*: Odonata). *Can. J. Zool.* 80: 944-950.

- Johansson F, Stoks R, Rowe L, De Block M (2001) Life history plasticity in a damselfly: effects of combined time and biotic constraints. *Ecology* 82: 1857-1869.
- Johnson KE & Eidiotis L (2005) Tadpole body zones differ with regard to strike frequencies and kill rates by dragonfly naiads. *Copeia* 2005: 909-913.
- Karban R & Baldwin IT (1997) *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
- Kats LB, Petranka JW & Sih A (1988) Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes. *Ecology* 69: 1865-1870.
- Kats LB & Dill LM (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5: 361-394.
- Kehr AI & Schnack JA (1991) Predator-prey relationship between giant water bugs (*Belostoma oxyurum*) and larval anurans (*Bufo arenarum*). *Alytes* 9: 61-69.
- Kehr AI & Gómez VI (2009) Intestinal, body and tail plasticity in *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles induced by a predator insect (*Belostoma elegans*). *Adv. Stud. Biol.* 1: 85-94.
- Kiesecker JM, Chivers DP & Blaustein AR (1996) The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. *Anim. Behav.* 52: 1237-1245.
- Kishida O & Nishimura K (2004) Bulgy tadpoles: inducible defense morph. *Oecologia* 140: 414-421.
- Kishida O & Nishimura K (2005) Multiple inducible defences against multiple predators in the anuran tadpoles, *Rana pirica*. *Evol. Ecol. Res.* 7: 619-631.
- Kishida O & Nishimura K (2006) Flexible architecture of inducible morphological plasticity. *J. Anim. Ecol.* 75: 705-712.



- Kishida O, Mizuta Y & Nishimura K (2006) Reciprocal phenotypic plasticity in a predator-prey interaction between larval amphibians. *Ecology* 87: 1599-1604.
- Kotler BP, Brown JS & Mitchell WA (1994) The role of predation in shaping the behaviour, morphology and community organisation of desert rodents. *Aust. J. Zool.* 42: 449-466.
- Kraft PG, Franklin CE & Blows MW (2006) Predator-induced phenotypic plasticity in tadpoles: extension or innovation? *J. Evol. Biol.* 19: 1813-1818.
- Kruse KC & Stone BM (1984) Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) learn to avoid feeding on toad (*Bufo*) tadpoles. *Anim. Behav.* 32: 1035-1039.
- Kupferberg SJ (1997) Facilitation of periphyton production by tadpole grazing: functional differences between species. *Freshwater Biol.* 37: 427-439.
- Lane PA (1978) Role of invertebrate predation in structuring zooplankton communities. *Verh. int. Ver. Limnol.* 20: 485-480.
- Lane SJ & Mahoney MJ (2002) Larval anurans with synchronous and asynchronous development periods: contrasting responses to water reduction and predator presence. *J. Anim. Ecol.* 71: 780-792.
- Lardner B (1998) Plasticity or fixed adaptive traits? Strategies for predator avoidance in *Rana arvalis* tadpoles. *Oecologia* 117: 119-126.
- Lardner B (2000) Morphological and life history responses to predators in larvae of seven anurans. *Oikos* 88: 169-180.
- Lardner B & Loman J (1995) Predation on *Rana* and *Bufo* tadpoles: predator species and tadpole size effects. *Mem. Soc. Fauna Flora Fenn.* 71: 149.
- Laurila A, Kujasalo J (1999) Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J. Anim. Ecol.* 68: 1123-32.

- Laurila A, Kujasalo J & Ranta E (1998) Predator induced changes in life history in two anuran tadpoles: effects of predator diet. *Oikos* 83: 307-317.
- Laurila A, Pakkasmaa S & Merila J (2006) Population divergence in growth rate and antipredator defences in *Rana arvalis*. *Oecologia* 147:585-595.
- Lawler SP (1989) Behavioral responses to predation and predation risk in four species of larval anurans. *Anim. Behav.* 38: 1039-1047.
- Lawler KL & Hero JM (1997) Palatability of *Bufo marinus* tadpoles to a predatory fish decreases with development. *Wildlife Res.* 24: 327-334.
- Lima SL & Bednekoff PA (1999) Temporal variation in danger drives antipredator behaviour: the predation risk allocation hypothesis. *Am. Nat.* 153: 649-659.
- 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 (2001) Effects of tadpole grazing on periphytic algae in ponds. *Wetl. Ecol. Manag.* 9: 135-139.
- 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 & Claesson D (2003) Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: test of cost models. *Evol. Ecol. Res.* 5: 179-194.
- Lundkvist E, Landin J, Jackson M, Svensson C (2003) Diving beetles (Dytiscidae) as predators of mosquito larvae (Culicidae) in field experiments and in laboratory tests of prey preference. *Bull. Entomol. Res.* 93: 219-26.
- Martin P & Bateson P (1993) *Measuring behaviour. An introductory guide.* Cambridge University Press. Cambridge, UK.

- Mathis A, Murray KL & Hickman CR (2003) Do experience and body size play a role in responses of larval ringed salamanders, *Ambystoma annulatum*, to predator kairomones? Laboratory and field assays. *Ethology* 109: 159-170.
- Mazzucconi SA (2008) Notonectidae. *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos* 2: 209-221.
- McCollum SA & Van Buskirk J (1996) Costs and benefits of a predator-induced polyphenism in the gray treefrog *Hyla chrysoscelis*. *Evolution* 50: 583-593.
- McCollum SA & Leimberger JD (1997) Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole color, shape, and growth rate. *Oecologia* 109: 615-621.
- McCoy MW, Bolker BM, Osenberg CW, Miner BG & Vonesh JR (2006) Size correction: comparing morphological traits among populations and environments. *Oecologia* 148: 547-554.
- McIntyre PB, Baldwin S & Flecker AS (2004) Effects of behavioral and morphological plasticity on risk of predation in a neotropical tadpole. *Oecologia* 141: 130-138.
- McPeck MA (1996) Tradeoffs, food web structure, and the coexistence of habitat specialists and generalists. *Am. Nat.* 148: 124-138.
- Melo MC (2009) Biodiversidad de Heteroptera (Hemiptera) acuáticas y semiacuáticas de la Patagonia argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 68: 177-185.
- Menke AS (1979) Family Belostomatidae-giant water bugs, electric light bugs: toe biters, pp. 76-86. In: A. S. Menke (ed). *The semiaquatic and aquatic Hemiptera of California (Heteroptera: Hemiptera)*. *Bulltin California Insect Survey*. 21. Univ. Calif. Press. Berkeley.

- Merila J, Laurila A & Lindgren B (2004) Variation in the degree and costs of adaptive phenotypic plasticity among *Rana temporaria* populations. *J. Evol. Biol.* 17: 1132-1140.
- Mikolajewski DJ & Johansson F (2004) Morphological and behavioral defenses in dragonfly larvae: trait compensation and cospecialization. *Behav. Ecol.* 15: 614-620.
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK & Relyea RA (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* 20: 685-692.
- Moore RD, Newton B & Sih A (1996) Delayed hatching as a response of streamside salamander eggs to chemical cues from predatory sunfish. *Oikos* 77: 331-335.
- Morey S & Reznick D (2000) A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81: 1736-1749.
- Morey S & Reznick D (2001) Effects of larval density on postmetamorphic spadefoot toads (*Spea hammondi*). *Ecology* 82: 510-522.
- Morey SR & Reznick DN (2004) The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos* 104: 172-190.
- Morin PJ (1983) Predation, competition, and the composition of larval anuran guilds. *Ecol. Monogr.* 53: 119-138.
- Morin PJ (1985) Predation intensity, prey survival and injury frequency in an amphibian predator-prey interaction. *Copeia* 1985: 638-644.
- Morin PJ (1987) Predation, breeding asynchrony, and the outcome of competition among treefrog tadpoles. *Ecology* 68: 675-683.
- Morin PJ, Lawler SP & Johnson EA (1990) Ecology and breeding phenology of larval *Hyla andersonii*: the disadvantages of breeding late. *Ecology* 71: 1590-1598.

- Morrone JJ, Mazzucconi S & Bachmann AO (2004) Distributional patterns of chacoan water bugs (Heteroptera: Belostomatidae, Corixidae, Micronectinae and Gerridae). *Hydrobiol.* 523: 159-173.
- Muzón J (1995) Los Odonata de la Patagonia argentina. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 54: 1-14.
- Muzón J (1997) Odonata (Insecta) from Patagonia: species richness and distributional patterns. *Biogeographica* 73: 123-133.
- Muzón J, Spinelli GR, Pessacq P, Von Ellenrieder N, Estévez AL, Marino PI, Perez Goodwyn PJ, Angrisano EB, Díaz F, Fernández LA, Mazzuconi S, Rossi G & Salomón OD (2005) Insectos acuáticos de la Meseta del Somuncura, Patagonia, Argentina. Inventario preliminar. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 64: 47-68.
- Newman RA (1988a) Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Evolution* 42: 774-783.
- Newman RA (1988b) Genetic variation for larval anuran (*Scaphiopus couchii*) development time in an uncertain environment. *Evolution* 42: 763-773.
- Newman RA (1989) Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70: 1775-1787.
- Newman RA (1992) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* 42: 671-678.
- Newman RA (1994) Effects of changing density and food level on metamorphosis of a desert amphibian, *Scaphiopus couchii*. *Ecology* 75: 1085-1096.
- Newman RA (1998) Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* 115: 9-16.

- Nicieza AG, Álvarez D & Atienza EMS (2006) Delayed effects of larval predation risk and food quality on anuran juvenile performance. *J. Evol. Biol.* 19: 1092-1103.
- Nylin S, Wickman PO & Wiklund C (1989) Seasonal plasticity in growth and development of the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria* (Satyrinae). *Biol. J. Linn. Soc.* 38: 155-171.
- Oertli B, Joye DA, Castella E, Juge R, Lehmann A & Lachavanne J-B (2005) PLOCH: a standardized method for sampling and assessing the biodiversity in ponds. *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 15: 665-679.
- Ohba S (2009) Ontogenetic dietary shift in the larvae of *Cybister japonicus* (Coleoptera: Dytiscidae) in Japanese rice fields. *Environ. Entomol.* 38: 856-860.
- Orizaola G & Braña F (2003) The response of predator-naïve newt larvae to food and predator presence. *Can. J. Zool.* 81: 1845-1850.
- Orizaola G & Braña F (2004) Hatching responses of four newt species to predatory fish chemical cues. *Ann. Zool. Fennici* 41: 635-645.
- Orizaola G & Braña F (2005) Plasticity in newt metamorphosis: the effect of predation at embryonic and larval stages. *Freshwater Biol.* 50: 438-446.
- Orton GL (1953) The systematics of vertebrate larvae. *Syst. Zool.* 2: 63-75.
- Patterson JW & McLachlan AJ (1989) Larval habitat duration and size at metamorphosis in frogs. *Hydrobiol.* 171: 121-126.
- Peacor SD & Werner EE (2000) Predator Effects on an assemblage of consumers through induced changes in consumer foraging behavior. *Ecology* 81: 1998-2010.
- Peacor SD & Werner EE (2004) Context dependence of nonlethal effects of a predator on prey growth. *Israel J. Zool.* 50: 139-167.

- Peckarsky BL, Cowan CA, Penton MA, Anderson C (1993) Sublethal consequences of stream-dwelling predatory stoneflies on mayfly growth and fecundity. *Ecology* 74: 1836-1846.
- Peckarsky BL, Taylor BW, McIntosh AR, McPeck MA & Lytle DA (2001) Variation in mayfly size at metamorphosis as a developmental response to risk of predation. *Ecology* 82: 740-757.
- Perotti MG, Diéguez MC & Jara FG (2005) State of the knowledge of north Patagonian wetlands (Argentina): major aspects and importance for regional biodiversity conservation. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 78: 723-737.
- Perotti MG, Fitzgerald LA, Moreno L & Pueta M (2006) Behavioral responses of *Bufo arenarum* tadpoles to odonate naiad predation. *Herpetol. Conserv. Biol.* 1: 117-120.
- Peterson JA & Blaustein AR (1992) Relative palatabilities of anuran larvae to natural aquatic insect predators. *Copeia* 1992: 577-584.
- Peterson AG, Bull CM & Wheeler LM (1992) Habitat choice and predator avoidance in tadpoles. *J. Herpetol.* 26:142-146.
- Petranka JW, Kats LB & Sih A (1987) Predator-prey interactions among fish and larval amphibians: use of chemical cues to detect predatory fish. *Anim. Behav.* 35: 420-425.
- Pfennig DW (1992) Polyphenism in spadefoot toad tadpoles as a locally adjusted evolutionarily stable strategy. *Evolution* 46: 1408-1420.
- Pfennig DW, Mabry A & Orange D (1991) Environmental causes of correlations between age and size at metamorphosis in *Scaphiopus multiplicatus*. *Ecology* 72: 2240-2248.

- Pigliucci M, Murren CJ & Schlichting CD (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* 209: 2362-2367.
- Reading CJ (1990) Palmate newt predation on common frog, *Rana temporaria*, and common toad, *Bufo bufo*, tadpoles. *Herpetol. J.* 1: 462-465.
- Relyea RA (2001a) Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology* 82: 523-540.
- Relyea RA (2001b) The relationship between predation risk and antipredator responses in larval anurans. *Ecology* 82: 541-554.
- Relyea RA (2002) Costs of phenotypic plasticity. *Am. Nat.* 159: 272-282.
- Relyea RA (2003) Predators come and predators go: the reversibility of predator-induced traits. *Ecology* 84: 1840-1848.
- Relyea RA (2005) The heritability of inducible defenses in tadpoles. *J. Evol. Biol.* 18: 856-866.
- Relyea RA & Werner EE (1999) Quantifying the relation between predator-induced behavior and growth performance in larval anurans. *Ecology* 80: 2117-2124.
- Relyea RA & Werner EE (2000) Morphological plasticity in four larval anurans distributed along an environmental gradient. *Copeia* 2000: 178-190.
- Relyea RA & Hoverman JT (2003) The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia* 134: 596-604.
- Reznick DN (1990) Plasticity in age and size at maturity in male guppies (*Poecilia reticulata*): an experimental evaluation of alternative models of development. *J. Evol. Biol.* 3: 185-203.



- Richards SJ & Bull CM (1990) Size-limited predation on tadpoles of three Australian frogs. *Copeia* 1990: 1041-1046.
- Richardson JML (2001) A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators. *Behav. Ecol.* 12: 51-58
- Richardson JML (2006) Novel features of an inducible defense system in larval tree frogs (*Hyla chrysoscelis*). *Ecology* 87: 780-787.
- Richter-Boix A, Llorente GA & Montori A (2006) A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evol. Ecol. Res.* 8: 1139-1154.
- Richter-Boix A, Llorente GA & Montori A (2007) A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiol.* 583: 43-56.
- Roff DA (1992) Life history evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Roth A & Jackson J (1987) The effect of pool size on recruitment of predatory insects and on mortality in a larval anuran. *Herpetologica* 43: 224-232.
- Rowe L & Ludwig D (1991) Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology* 72: 413-427.
- Rudolf VHW & Rodel M-O (2007) Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. *Evol. Ecol.* 21: 121-142.
- Ryan TJ & Winne CT (2001) Effects of hydroperiod on metamorphosis in *Rana sphenocephala*. *Am. Midl. Nat.* 145: 46-53.
- Sanuy D, Oromí N & Galofré A (2008) Effects of temperature on embryonic and larval development and growth in the natterjack toad (*Bufo calamita*) in a semi-arid zone. *Anim. Biodivers. Conserv.* 31: 41-46.

- Semlitsch RD & Caldwell JP (1982) Effects of density on growth, metamorphosis, and survivorship in tadpoles of *Scaphiopus holbrooki*. *Ecology* 63: 905-911.
- Schneider DW & Frost TM (1996) Habitat duration and community structure in temporary ponds. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 15: 64-86.
- Stearns SC (1989) The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *Bioscience* 39: 436-445.
- Stearns S (1992) The evolution of life histories. Oxford: Oxford University Press.
- Savage AA (1989) Adults of the british aquatic Hemiptera Heteroptera. A key with ecological notes. Freshwater Biological Association, Scientific Publication N° 50: 1-173.
- Scarabotti PA, López JA & Ghirardi R (2007) Behavioral responses of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae) to fish chemical cues. *Cuad. Herpetol.* 21: 45-52.
- Schmidt BR & Amézquita A (2001) Predator-induced behavioral responses: tadpoles of neotropical frog *Phyllomedusa tarsius* do not respond to all predators. *Herpetol. J.* 11: 9-15.
- Schmitz OJ, Beckerman AP & O'Brien KM (1997) Behaviorally mediated trophic cascades: effects of predation risk on food web interactions. *Ecology* 78: 1388-1399.
- Schnack JA (1976) Los Belostomatidae de la República Argentina (Hemiptera). In: Ringuet RA (ed.). Fauna de agua dulce de la República Argentina. 35(1) FECIC, Buenos Aires.
- Schnack JA, Domizi EA & Estévez AL (1990) Comportamiento reproductivo de *Belostoma oxyurum*. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 48: 121-128.

- Schneider DW & Frost TM (1996) Habitat duration and community structure in temporary ponds. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 15: 64-86.
- Schoeppner NM & Relyea RA (2005) Damage, digestion, and defence: the roles of alarm cues and kairomones for inducing prey defences. *Ecol. Lett.* 8: 505-512
- Schoeppner NM & Relyea RA (2008) Detecting small environmental differences: risk-response curves for predator-induced behavior and morphology. *Oecologia* 154: 743-754.
- Semlitsch RD (1990) Effects of body size, sibship, and tail injury on the susceptibility of tadpoles to dragonfly predation. *Can. J. Zool.* 68: 1027-1030.
- Semlitsch RD & Gavasso S (1992) Behavioral responses of *Bufo bufo* and *Bufo calamita* to chemical cues of vertebrate and invertebrate predators. *Ethol. Ecol. Evol.* 4: 165-173.
- Sharma SS, Veeranagoudar DK, Shanbhag BA & Saidapur SK (2008) Activity of *Sphaerotheca breviceps* tadpoles in response to chemical cues of the predaceous tadpoles *Hoplobatrachus tigerinus*. *J. Ethol.* 26: 303-307.
- SigmaStat 2006. SigmaStat for Windows 3.5. Systat Software inc.
- Sih A (1987) Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview. In: *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities* (Sih A & Kerfoot WC, Eds.), pp. 203-224. Hanover, New Hampshire: University Press of New England.
- Sih A (1992) Integrative approaches to the study of predation: general thoughts and a case study on sunfish and salamander larvae. *Ann. Zool. Fennici* 29: 183-198.
- Sih A & Kats LB (1994) Age, experience, and the response of streamside salamander hatchlings to chemical cues from predatory sunfish. *Ethology* 96: 253-259.

- Sih A, Englund G & Wooster D (1998) Emergent impacts of multiple predators on prey. *Trends Ecol. Evol.* 13: 350-355.
- Skelly DK & Werner EE (1990) Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. *Ecology* 71: 2313-2322.
- Skelly DK (1994) Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation. *Anim. Behav.* 47: 465-468.
- Skelly DK (1995) A behavioural trade-off and its consequences for the distribution of *Pseudacris* treefrog larvae. *Ecology* 76: 150-164.
- Skelly DK (1996) Pond drying, predators and the distribution of *Pseudacris* tadpoles. *Copeia* 1996: 599-605.
- Skelly DK (1997) Tadpole communities. *Am. Scient.* 85: 36-45.
- Smith DC (1983) Factor controlling tadpole populations of the chorus frog (*Pseudacris triseriata*) on Isle Royale, Michigan. *Ecology* 64: 501-510.
- Smith DC & Van Buskirk J (1995) Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. *Am. Nat.* 145: 211-233.
- Sprules WG (1972) Effects of size-selective predation and food competition on high altitude zooplankton communities. *Ecology* 53: 375-386.
- Spencer M, Blaustein L, Schwartz SS & Cohen JE (1999) Species richness and the proportion of predatory animal species in temporary freshwater pools: relationships with habitat size and permanence. *Ecol. Lett.* 2: 157-166.
- Spieler M (2003) Risk of predation affects aggregation size: a study with tadpoles of *Phrynomantis microps* (Anura: Microhylidae). *Anim. Behav.* 65: 179-184.
- Spieler M & Linsenmair KE (1999) Aggregation behaviour of *Bufo maculatus* tadpoles as an antipredator mechanism. *Ethology* 105: 665-686.

- SPSS 1997. SYSTAT 7.0 for Windows: Statistics. Chicago: SPSS.
- Stauffer HP & Semlitsch RD (1993) Effects of visual, chemical and tactile cues of fish on the behavioural responses of tadpoles. *Anim. Behav.* 46: 355-364.
- Stav G, Kotler BP & Blaustein L (2007) Direct and indirect effects of dragonfly (*Anax imperator*) nymphs on green toad (*Bufo viridis*) tadpoles. *Hydrobiol.* 579: 85-93.
- Steiner UK & Van Buskirk J (2008) Environmental stress and the costs of whole-organism phenotypic plasticity in tadpoles. *J. Evol. Biol.* 21: 97-103.
- Streams FA (1982) Diel foraging and reproductive periodicity in *Notonecta undulata* Say (Heteroptera). *Aquat. Insect* 4: 111-119.
- Streams FA (1987) Foraging behaviour in a Notonectid assemblage. *Am. Midl. Nat.* 117: 353-361.
- Sullivan AM, Maerz JC & Madison DM (2002) Anti-predator response of red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*) to chemical cues from garter snakes (*Thamnophis sirtalis*): laboratory and field experiments. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51: 227-233.
- Swart CC & Taylor RC (2004) Behavioral interactions between the giant water bug (*Belostoma lutarium*) and tadpoles of *Bufo woodhousii*. *Southeast. Nat.* 3: 13-24.
- Sanuy D, Oromí N & Galofré A (2008) Effects of temperature on embryonic and larval development and growth in the natterjack toad (*Bufo calamita*) in a semi-arid zone. *Anim. Biodiv. Conserv.* 31: 41-46.
- Scheiner SM & Berrigan D (1998) The genetics of phenotypic plasticity. The cost of plasticity in *Daphnia pulex*. *Evolution* 52: 368-378.
- Schlichting CD (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17: 667-694.

- Scott DE (1994) The effect of larval density on adult demographic traits in *Ambystoma opacum*. *Ecology* 75: 1383-1396.
- Semlitsch RD, Scott DE & Pechmann JHK (1988) Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69: 184-192.
- Seale DB (1980): Influence of amphibian larvae on primary production, nutrient flux, and competition in a pond ecosystem. *Ecology* 61: 1531-1550.
- Serra M, Snell TW & King CE (2003) The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. En: Font E & Moya A (eds.), 135-146 pp. *Evolution: from molecules to ecosystems*. Oxford University Press, Oxford..
- Smith DC (1987) Adult recruitment in chorus frogs: effect of size and date of metamorphosis. *Ecology* 68: 344-350.
- Smith RL (1997) Evolution of paternal care in the giant water bugs (Heteroptera: Belostomatidae). In *Social Behavior in Insects and Arachnids*. Choe JC & Crespi BJ eds. Cambridge, University Press.
- Soler M, Carranza J, Rivera AC, Moreno J, Senar JC & Soler JJ (2001) Traducción al español de los términos ingleses más conflictivos utilizados en etología, ecología y evolución. *Etología* 9: 43-46.
- Sympson V, Jara FG & Úbeda CA (2006) *Bufo spinulosus papillosus*. Reproduction. *Herpetol. Rev.* 37: 200-201.
- Takahara T, Kohmatsu Y, Maruyama A & Yamaoka R (2003) Effects of chemical cues on tadpole survival. *Ecol. Res.* 18: 793-796.

- Takahara T, Kohmatsu Y & Yamaoka R (2008a) Predator-avoidance behavior in anuran tadpoles: a new bioassay for characterization of water-soluble cues. *Hydrobiol.* 607: 123-130.
- Takahara T, Kohmatsu Y, Maruyama A & Yamaoka R (2008b) Benefit of suites of defensive behavior induced by predator chemical cues on anuran tadpoles, *Hyla japonica*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63: 235-240.
- Taylor BW, Anderson CR & Peckarsky BL (1998) The effect of size at emergence on stonefly fecundity, longevity, and reproductive success. *Oecologia* 114: 494-502.
- Tejedo M & Reques R (1994) Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: the interactive effects of density and pond duration. *Oikos* 71: 295-304.
- Teplitsky C, Plenet S, Lena J-P, Mermet N, Malet E & Joly P (2005) Escape behaviour and ultimate causes of specific induced defences in an anuran tadpole. *J. Evol. Biol.* 18: 180-190.
- The red list of threatened species (IUCN). <http://www.iucnredlist.org/initiatives>.
- Thompson DB (1999) Genotype-environment interaction and the ontogeny of diet induced phenotypic plasticity in size and shape of *Melanoplus femurrubrum* (Orthoptera: Acrididae). *J. Evol. Biol.* 12: 38-48.
- Toledo LF (2003) Predation on seven south american anuran species by water bugs (Belostomatidae). *Phyllomedusa* 2: 105-108.
- Tollrian R & Harvell CD (1998) The evolution of inducible defenses. Princeton University Press, Princeton, New York.
- Touchon JC & Warkentin KM (2008) Fish and dragonfly nymph predators induce opposite shifts in color and morphology of tadpoles. *Oikos* 117: 634-640.

- Travis J, Keen WH & Julianna J (1985) The role of relative body size in a predator-prey relationship between dragonfly naiads and larval anurans. *Oikos* 45: 59-65.
- Trochine C, Balseiro E, Modenutti B (2008) Zooplankton of fishless ponds of northern patagonia: insights into predation effects of *Mesostoma ehrenbergii*. *Int. Rev. Hydrobiol.* 93: 312-327.
- Twombly S (1996) Timing of metamorphosis in a freshwater crustacean: comparison with anuran models. *Ecology* 77: 1855-1866.
- Úbeda CA (1998) Batracofauna de los bosques templados patagónicos: un enfoque ecobiogeográfico. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires, 354pp.
- Ultsch GR, Bradford DF, Freda J (1999) Physiology: coping with the environment. In: McDiarmid RW, Altig R, editors, 189-214 pp. *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. Chicago: University of Chicago Press..
- Urban MC (2004) Disturbance heterogeneity determines freshwater metacommunity structure. *Ecology* 85: 2971-2978.
- Urban MC (2007) Predator size and phenology shape prey survival in temporary ponds. *Oecologia* 154: 571-580.
- van der Valk AG (2006) *Biology of habitats: the biology of freshwater wetlands*. Oxford University Press, New York.
- van Tienderen PH (1991) Evolution of generalists and specialists in spatially heterogeneous environments. *Evolution* 45: 1317-1331.
- Van Buskirk J (2000) The costs of an inducible defense in anuran larvae. *Ecology* 81: 2813-2821.



- Van Buskirk J (2001) Specific induced responses to different predator species in anuran larvae. *J. Evol. Biol.* 14: 482-489.
- Van Buskirk J (2002) A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. *Am. Nat.* 160: 87-102.
- Van Buskirk J & McCollum SA (1999) Plasticity and selection explain variation in tadpole phenotype between ponds with different predator composition. *Oikos* 85: 31-39.
- Van Buskirk J & McCollum SA (2000) Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: morphology and behaviour influence mortality risk from predation. *J. Evol. Biol.* 13: 336-347.
- Van Buskirk J & Saxer G (2001) Delayed costs of an induced defence in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evolution* 55: 821-829.
- Van Buskirk J, McCollum SA, Werner EE (1997) Natural selection for environmentally-induced phenotypes in tadpoles. *Evolution* 51: 1983-1992.
- Van Buskirk J, Anderwald P, Lupold S, Reinhardt L & Schuler H (2003) The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes. *J. Herpetol.* 37: 420-424.
- Vences M, Puente M, Nieto S & Vieites DR (2002) Phenotypic plasticity of anuran larvae: environmental variables influence body shape and oral morphology in *Rana temporaria* tadpoles. *J. Zool.* 257: 155-162.
- Via S & Lande R (1985) Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505-522.

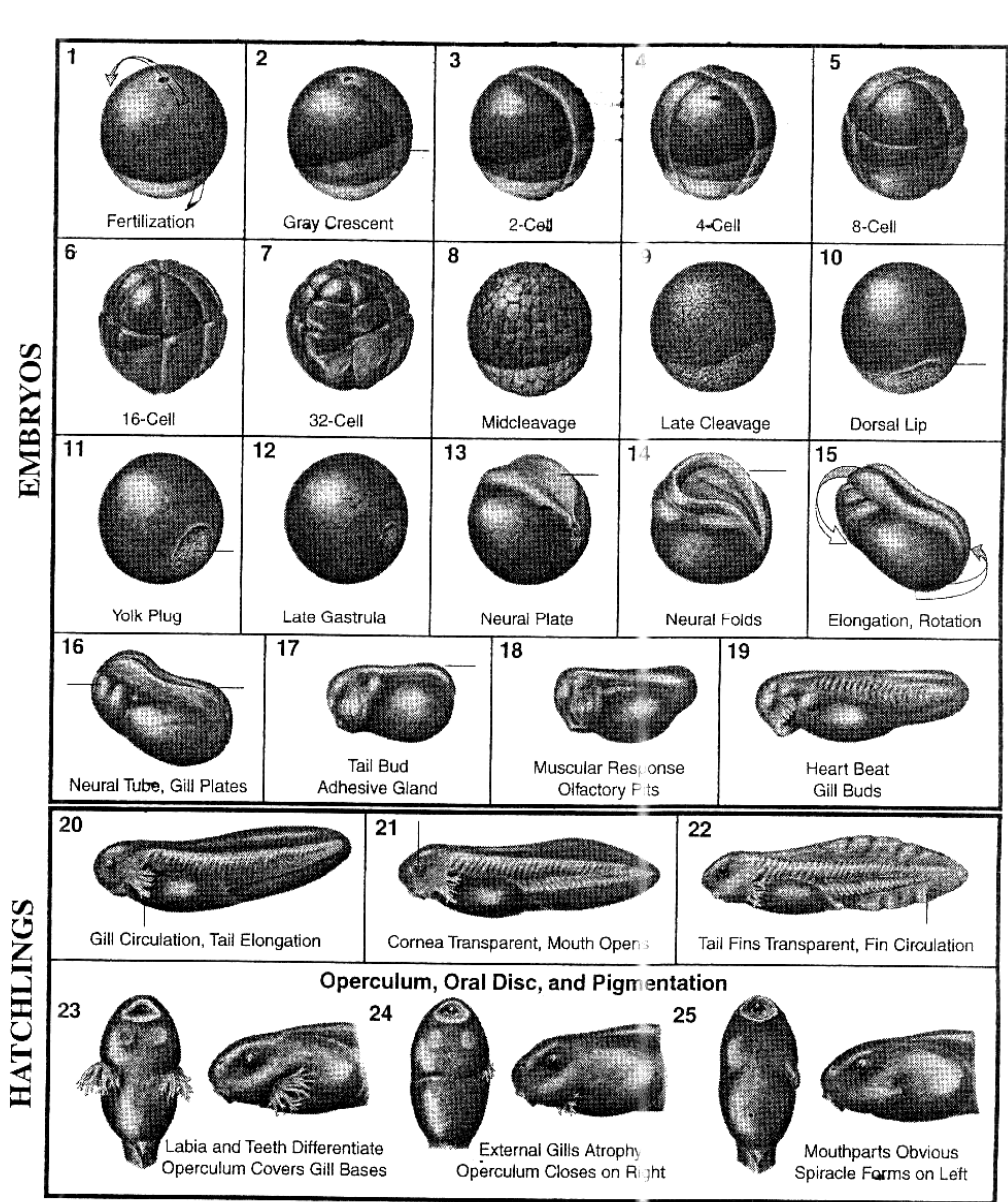
- Vonesh JR (2003) Sequential predation in a complex life-history: interactions among egg, larval, and post-metamorphic predators of the east african treefrog, *Hyperolius spinigularis*. PhD Thesis. University of Florida (USA), 131 pp.
- Vonesh JR & Osenberg CW (2003) Multi-predator effects across life-history stages: non-additivity of egg-and larval-stage predation in an African treefrog. *Ecol. Lett.* 6: 503-508.
- Vonesh JR & Warkentin KM (2006) Opposite shifts in size at metamorphosis in response to larval and metamorph predators. *Ecology* 87: 556-562.
- Waldman B & Adler K (1979) Toad tadpoles associate preferentially with siblings. *Nature* 282: 611-613.
- Warkentin KM (2000) Wasp predation and wasp-induced hatching of red-eyed treefrog eggs. *Anim. Behav.* 60: 503-510.
- Watt PJ, Nottingham SF & Young S (1997) Toad tadpole aggregation behaviour: evidence for a predator avoidance function. *Anim. Behav.* 54: 865-872.
- Wassersug RJ (1973) Aspects of social behavior in anuran larvae. en J. L. Vial (ed), 273-297 pp. *Evolutionary biology of anurans: Contemporary research on major problems*. Univ. Missouri Press, Columbia.
- Wassersug RJ & Sperry DG (1977) The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology* 58: 830-839.
- Wassersug RJ & Hoff KS (1985) The kinematics of swimming in anuran larvae. *J. Exp. Biol.* 119: 1-30.
- Weigandt M, Úbeda CA & Díaz M (2004) The larva of *Pleurodema bufoninum* Bell, 1843, with comments on its biology and on the egg strings (Anura, Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia* 25: 429-437.

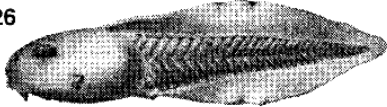
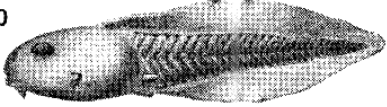

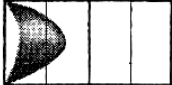
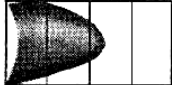
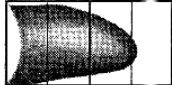

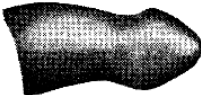
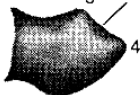
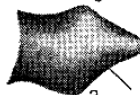
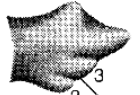
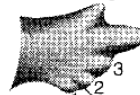





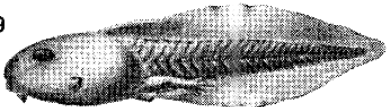

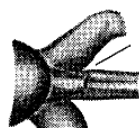
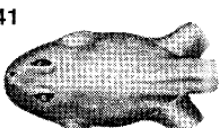

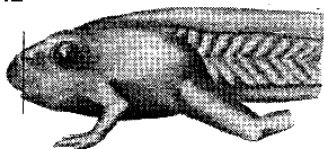
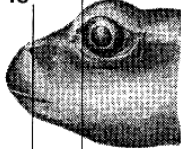
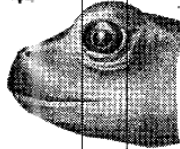
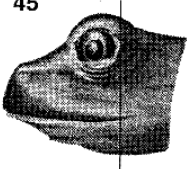
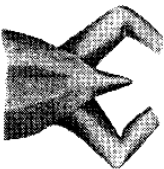
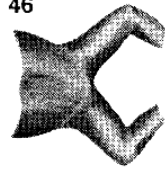
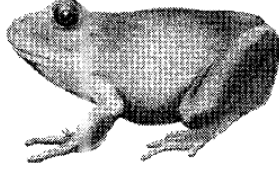
- West-Eberhard MJ (1989) Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 20: 249-278.
- Wellborn GA, Skelly DK & Werner EE (1996) Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 337-363.
- Werner EE (1991) Nonlethal effects of a predator on competitive interactions between two anuran larvae. *Ecology* 72: 1709-1720.
- Werner EE & Anholt BR (1993) Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality rates mediated by foraging activity. *Am. Nat.* 142: 242-272.
- Werner EE & Anholt BR (1996) Predator-induced behavioural indirect effects: consequences to competitive interactions in anuran larvae. *Ecology* 77: 157-169.
- Werner EE & Peacor SD (2003) A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology* 84: 1083-1100.
- Werner EE, Relyea RA, Yurewicz KL, Skelly DK & Davis CJ (2009) Comparative landscape dynamics of two anuran species: climate-driven interaction of local and regional processes. *Ecol. Monograp.* 79: 503-521.
- Wilbur HM (1977a) Density-dependent aspects of growth and metamorphosis in *Bufo americanus*. *Ecology* 58: 196-200.
- Wilbur HM (1977b) Interactions of food level and population density in *Rana sylvatica*. *Ecology* 58: 206-209.
- Wilbur HM (1980) Complex life cycles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11: 67-93.
- Wilbur HM (1987) Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology* 68: 1437-1452.

- Wilbur HM (1997) Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. The Robert H. Mac-Arthur Award lecture. *Ecology* 78: 2279-2302.
- Wilbur HM & Collins JP (1973) Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305-1314.
- Williams DD (1987) *The Ecology of Temporary Waters*, Timber Press, Portland, Oregon.
- Williams DD (1996a) Environmental constraints in temporary freshwaters and consequences for the insect fauna. *J. North. Am. Benth. Soc.* 15: 634-650.
- Williams DD (1996b) Temporary ponds and their invertebrate communities. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 7: 105-117.
- Williams DD (1997) Temporary ponds and their invertebrate communities. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 7: 105-117.
- Wisenden BD (2000) Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 355: 1205-1208.
- Wissinger SA, Bohonak AJ, Whiteman HH & Brown WS (1999) *Invertebrates in Freshwater Wetlands of North America, Habitat Permanence, salamander predation, and invertebrate communities*. John Wiley & Sons.
- Zagarese HE, Diaz M, Queimaliños C, Pedrozo F & Úbeda C (1999) Mountain lakes in northwestern Patagonia. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27: 1-6.
- Zhivotovsky LA, Feldman MW & Bergman A (1996) On the evolution of phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Evolution* 50: 547-558.

APÉNDICE 1.

Estadios de desarrollo propuestos por Gosner (1960). Tomada de Viertel & Richter (1999).



		<b>Hind Limb Bud Development</b>								
		26			30					
										
		26 $L < \frac{1}{2} D$	27 $L \geq \frac{1}{2} D$	28 $L \geq D$	29 $L \geq 1\frac{1}{2} D$	30 $L = 2D$				
										
										
<b>LARVAE</b>	<b>Toe Differentiation and Development</b>									
	31		32		33		34		35	
										
	Foot Paddle		Indentation 4-5		Indentation 3-4		Indentation 2-3		Indentation 1-2	
	36		37		38		39			
										
	Toes 3-5 Separated		All Toes Separated		Metatarsal Tubercle		Subarticular Patches			
	36		39							
										
	40		41							
										
Foot Tubercles		Vent Tube Present		Forelimbs Visible, Mouthparts Atrophy, Vent Tube Gone						
<b>METAMORPHS</b>	42		43		44					
										
	Forelimbs Emerge Mouth Anterior to Nostril		Mouth Between Nostril and Eye Tail Atrophies		Mouth Beneath Eye Tail Greatly Reduced					
	45		46							
										
	Mouth Posterior to Eye		Tail Stub		Tail Resorbed		Metamorphosis Complete			

## APÉNDICE II.

Características biológicas y ecológicas de las cuatro especies de insectos depredadores más frecuentes en el área de estudio.

***Rhionaeschna variegata*** (Odonata: Aeshnidae). Es el odonato más ubicuo y ampliamente distribuido en Patagonia. Su distribución se extiende desde Mendoza hasta Tierra del Fuego, donde es la única especie de odonato presente (Muzón, 1995, 1997; Muzón *et al.*, 2005). Se reproduce tanto en humedales temporarios como permanentes, donde sus náyades pueden pasar al menos un invierno en el agua (Muzón *com. pers.*; Jara, *obs. pers.*). Las náyades alcanzan hasta 5 cm de longitud en su último estadio previo a la metamorfosis (Jara, *obs. pers.*). Consumen una gran variedad de presas como copépodos, cladóceros, notonéctidos, larvas de mosquitos y de otros odonatos (Perotti *et al.*, 2004), y también renacuajos (Casanovas & Úbeda, 2006; Jara & Perotti, 2006). Se ha comprobado que las náyades de odonatos detectan a sus presas por medio de estímulos visuales y mecánicos (Richards & Bull, 1990; Azevedo-Ramos *et al.*, 1992; Skelly, 1994). En las náyades de *R. variegata* se han observado dos estrategias de depredación: 1) acechar (“sit and wait”) desde una percha (Casanovas & Úbeda, 2006) y 2) acercarse a la presa caminando sobre el fondo con movimientos lentos (Jara & Perotti, 2006). El tamaño de presa que pueden capturar las náyades es directamente proporcional a su tamaño, por lo que las náyades de mayor talla pueden acceder a renacuajos grandes y/o en estadios avanzados (41-42, sensu Gosner, 1960) (Casanovas & Úbeda, 2009; Jara, datos no publicados).

*Belostoma bifoveolatum* (Heteroptera: Belostomatidae). Es el único belostomátido presente en el área de estudio y su distribución se extiende desde el norte de la Argentina hasta la provincia de Chubut (Morrone *et al.*, 2004; Melo, 2009); también habita en Chile. Vive en casi todos los sistemas serranos de Argentina, encontrándose tanto en arroyos como zanjas de corriente lenta y mediana, en general con abundante vegetación (Bachmann, 1963). Como otros belostomátidos presentan hábitos acuáticos y semiacuáticos asociados fuertemente a la vegetación acuática de ambiente lénticos temporarios o permanentes. A pesar de ser eminentemente acuáticos, suelen abandonar temporalmente su medio natural, fuera del cual manifiestan gran aptitud para el vuelo (Schnack, 1976). Esto generalmente ocurre cuando se extinguen los cuerpos de agua que habitan (Armúa de Reyes & Estévez, 2005). Una característica particular de las especies de Belostomatidae es el comportamiento reproductivo. Los machos incuban los huevos adheridos sobre su superficie dorsal, que son puestos por las hembras en el transcurso del apareamiento (Schnack *et. al.*, 1990; Armúa de Reyes & Estévez, 2005). Presentan un aparato bucal suctopizador y se han descrito como depredadores al acecho o “sit-and-way”. Emplean el primer par de patas modificados para capturar a sus presas. Se alimentan de una gran variedad de invertebrados que incluyen desde caracoles hasta larvas de mosquitos (Menke, 1979; Smith, 1997; Armúa de Reyes & Estévez, 2005), además pueden consumir peces pequeños como así también larvas y adultos de anfibios (Kehr & Schnack, 1991; Toledo, 2003).

*Notonecta vereertbruggheni* (Heteroptera: Notonectidae). Es un notonéctido de gran tamaño exclusivo de la Patagonia y su distribución abarca las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut (Melo, 2009). Comparte el área de estudio con otras dos especies menos comunes y abundantes como *N. fasi* y *N. virescens* (Jara, datos no publicados). Los notonéctidos poseen patas anteriores y medias cortas, adaptadas para atrapar presas



y para tomarse de objetos sumergidos (Mazzucconi, 2008). Su estrategia de caza se ha descrito como “sit-and-wait”: esperan inmóviles que se les aproximen presas móviles. Capturan a la presa con las patas anteriores y medias y la paralizan inyectándole saliva proteolítica tóxica, para luego absorber los tejidos ya digeridos (Giller, 1986; Savage, 1989). Viven en una amplia variedad de hábitats dulceacuícolas. Habitan frecuentemente todo tipo de ambientes lénticos, naturales (charcos, lagos, lagunas) y artificiales (zanjas, embalses, bebederos, piletas de natación, tanques, fuentes, arrozales) y con menor frecuencia ambientes lóticos (arroyos, ríos) en sectores de corriente lenta (Mazzucconi, 2008). Se los encuentra tanto en aguas transparentes como turbias, con y sin vegetación, en lugares expuestos y sombríos, en ambientes permanentes y temporarios. Son voraces y agresivos depredadores de invertebrados (pequeños crustáceos, larvas de mosquitos y quironómidos, e inclusive de sus propias larvas) y de peces y larvas de anfibios (Mazzucconi, 2008).

***Rhantus antarcticus*** (Coleoptera: Dytiscidae). Poca información se dispone de la ecología y biología de esta especie. Al menos dos subespecies se encuentran en el área bajo estudio, *Rhantus antarcticus antarcticus* y *R. antarcticus nahuelis*. Como otros coleópteros de la familia Dytiscidae, son de hábitos acuáticos en todo su ciclo de vida. Tanto las larvas como los adultos de este género son depredadores, pueden consumir desde larvas de mosquitos hasta vertebrados como por ejemplo renacuajos (Crump, 1984; Henrikson, 1990; Lundkvist *et al.*, 2003; Aditya *et al.*, 2006). Prefieren aguas lenticas y vegetadas. Poseen piezas bucales masticadoras con mandíbulas bien desarrolladas. Estas mandíbulas son acanaladas y estan adaptadas para perforar y succionar los líquidos internos de las presas (Domínguez & Fernández, 2009). Su estrategia de caza es “sit and wait” o al acecho, o bien después detectar a la presa se aproxima caminando sobre el fondo o la vegetación (Jara, *obs. pers.*).

## APÉNDICE III.

Matrices de correlaciones entre las variables morfológicas medidas y el primer componente (CP1) obtenido de los análisis de componentes principales (ACP) realizados para cada especie. \*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,0001$ .

Especie	Variable	CP1	Significancia
<i>Pleurodema thaul</i>			
30 días	Longitud de la cola	0,973	***
	Longitud del cuerpo	0,956	***
	Altura del cuerpo	0,948	***
	Altura de la aleta	0,877	***
	Altura de la musculatura caudal	0,888	***
60 días	Longitud de la cola	0,941	***
	Longitud del cuerpo	0,935	***
	Altura del cuerpo	0,936	***
	Altura de la aleta	0,852	***
	Altura de la musculatura caudal	0,956	***
<i>Pleurodema bufoninum</i>			
30 días	Longitud de la cola	0,94	***
	Longitud del cuerpo	0,891	***
	Altura del cuerpo	0,95	***
	Altura de la aleta	0,888	***
	Altura de la musculatura caudal	0,932	***
50 días	Longitud de la cola	0,953	***
	Longitud del cuerpo	0,934	***
	Altura del cuerpo	0,934	***
	Altura de la aleta	0,91	***
	Altura de la musculatura caudal	0,91	***
<i>Rhinella espinulosa</i>			
25 días	Longitud de la cola	0,803	***
	Longitud del cuerpo	0,902	***
	Altura del cuerpo	0,897	***
	Altura de la aleta	0,78	**
	Altura de la musculatura caudal	0,861	***

## Publicaciones

Hasta el momento los resultados de esta tesis han sido publicados parcialmente en los siguientes trabajos:

1. Jara FG & Perotti MG (2010) Risk of predation and behavioral response in three anuran species: influence of tadpole size and predator type. *Hydrobiologia* 644(1): 313-324. ISSN 0018-8158.
2. Jara FG & Perotti MG (2009) Toad tadpole responses to predator risk: Ontogenetic change between constitutive and inducible defenses. *Journal of Herpetology* 43(1): 82-88. ISSN 0022-1511.
3. Jara FG & Perotti MG (2006) Variación ontogenética en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus*, Philippi, 1902 (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología* 19(2): 37-42. ISSN 0326551X.



# Risk of predation and behavioural response in three anuran species: influence of tadpole size and predator type

Fabián Gastón Jara · María Gabriela Perotti

Received: 30 April 2009 / Revised: 11 February 2010 / Accepted: 22 February 2010 / Published online: 12 March 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Many species alter their activity, micro-habitat use, morphology and life history in response to predators. Predation risk is related to predator size and palatability of prey among others factors. We analyzed the predation risk of three species of tadpoles that occur in norwestern Patagonia, Argentina: *Pleurodema thaul*, *Pleurodema bufoninum* and *Rhinella spinulosa*. We sampled aquatic insect predators in 18 ponds to determine predator–tadpole assemblage in the study area. In laboratory conditions, we analysed the predation rate imposed by each predator on each tadpole species at different tadpole sizes. Finally, we tested whether tadpoles alter their activity in the presence of chemical and visual cues from predators. Small *P. thaul* and *P. bufoninum* tadpoles were the most vulnerable prey species, while small *R. spinulosa* tadpoles were only consumed by water bugs. Dragonflies and water bugs were the most dangerous tadpole predators. Small *P. thaul* tadpoles reduced their activity when they were exposed to all predators,

while large tadpoles only reduced the activity in the presence of large predators (dragonfly larvae and water bugs). Small *P. bufoninum* tadpoles reduced the activity when they were exposed to beetle larvae and dragonfly larvae, while large tadpoles only reduced activity when they were exposed to larger predators (water bugs and dragonfly larvae). *R. spinulosa* tadpoles were the less sensitive to presence of predators, only larger tadpoles responded significantly to dragonfly larvae by reducing their activity. We conclude that behavioural responses of these anuran species were predator-specific and related to the risk imposed by each predator.

**Keywords** Activity · Aquatic insects · Behavioural plasticity · *Pleurodema* · Prey size · *Rhinella*

## Introduction

Predation pressure is an important mechanism that influences the distribution of many amphibian species (Woodward, 1983; Crump, 1984). During the aquatic phase amphibians are faced with a wide range of invertebrate and vertebrate predators (Wassersug & Sperry, 1977; Vonesh, 2003). It is well known that predator richness and abundance vary greatly along the hydroperiod gradient. Permanent ponds often have fish which are highly effective predators on tadpoles. Although temporary aquatic habitats lack fish, they

---

Handling editor: L. B. Kats

---

F. G. Jara (✉) · M. G. Perotti  
Laboratorio de Fotobiología-INIBIOMA (CONICET),  
Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad  
Nacional del Comahue, Quintral 1250, 8400 San Carlos  
de Bariloche, Río Negro, Argentina  
e-mail: fjara@crub.uncoma.edu.ar

M. G. Perotti  
e-mail: perottigaby@yahoo.com

provide habitat for numerous aquatic invertebrates, many of which are effective tadpole predators (Brockelman, 1969; Calef, 1973; Heyer et al., 1975; Caldwell et al., 1980; Formanowicz & Brodie, 1982; Smith, 1983; Brendonck et al., 2002). The vulnerability of tadpoles to predators is related to their sizes, behavioural and morphological responses (Urban, 2007). Size-asymmetry between predators and prey often determines the outcome of predator–prey interactions (Wilson, 1975; Peters, 1983; Johnson et al., 2003; Urban, 2007). Gape and capture apparatus size frequently constrains a predator's ability to handle larger prey (Hambright, 1991; Takahara et al., 2003). In general, insects are not gape limited (i.e. they mechanically reduce the prey or pre-digest it before ingestion), allowing them to capture and consume prey larger than themselves. Size-ranges of prey that predators can handle vary among different insect taxa and are associated with their overall body size (Formanowicz, 1986; Allan et al., 1987; Jara, 2008). For example, small predators such as notonectids are much more limited to consuming relatively small prey size compared to larger dragonfly larvae or belostomatids (Travis et al., 1985; Cronin & Travis, 1986).

Tadpoles exhibit numerous defences when exposed to insect predators (Relyea, 2001a; McIntyre et al., 2004; Kishida & Nishimura, 2005; Teplitsky & Laurila, 2007). One antipredator adaptation in tadpoles is unpalatability. It is well known that several tadpole species have skin toxins that make them unpalatable to some predators (Kiesecker et al., 1996; Gunzburger & Travis, 2005). These antipredator strategies can also affect predator–prey interactions (Wilbur, 1997).

Many species alter their activity, microhabitat use, morphology and life history in response to predators (Lawler, 1989; Skelly, 1994; Stav et al., 2007). These inducible defences are plastic and displayed when predators are present (Miner et al., 2005). Specific responses are influenced by factors such as tadpole age, predator–prey coexistence, and tadpole palatability among others (Eklöv & Werner, 2000; Schmidt & Amézquita, 2001; Relyea, 2003; Kishida et al., 2006; Richter-Boix et al., 2008). For many species such phenotypic plasticity appears to function as a mechanism for coping with spatial or temporal variation in predator density within a single habitat type rather than as a mechanism allowing broader distribution across the habitat gradient. Some species have a specific response to each specific predator and not all species respond to

predators (Relyea, 2001b; Schmidt & Amézquita, 2001; Van Buskirk, 2001). In general, the most common behavioural response in tadpoles to predation risk/presence is reduced activity (Richardson, 2001). This behaviour reduces the visibility of prey and potential encounters when prey are exposed to visual-tactile predators like insects (Richards & Bull, 1990; Azevedo-Ramos et al., 1992; Skelly, 1994; Richardson, 2001). The tadpole species differ in natural activity rates, and several studies have shown that the species which inhabit less permanent ponds (lower predator densities) are more active than species inhabiting more permanent ponds (Skelly, 1995, 1996, 1997).

In Northwestern Patagonia, Argentina, the most common spring breeding anuran species are *P. thaul*, *P. bufoninum* (Leiuperidae) and *Rhinella spinulosa* (Bufonidae). These species primarily breed in temporary habitats; however, they occasionally reproduce in permanent habitats. The reproductive season starts during the austral spring and extends until early summer. The risk of predation varies among wetlands. Tadpoles of *R. spinulosa* are unpalatable for several insect predators (Jara & Perotti, 2006; 2009), while *P. thaul* and *P. bufoninum* tadpoles are palatable (Jara & Perotti, 2009). Palatability of *R. spinulosa* tadpoles change during ontogeny, with early unpalatable stages and late palatable stages (Jara & Perotti, 2009). Another antipredator strategy may be rapid growth, with tadpoles quickly reaching a body size that makes them less vulnerable to gape limited predators. Tadpoles of *P. thaul*, *P. bufoninum* and *R. spinulosa* are exposed to variable predation risk as they coexist with predaceous insects that also differ in size and foraging behaviour changing their relative density along the wetland hydroperiod.

This predator–prey system composed by a diversity of insect predators and tadpole species with different antipredator strategies (e.g. unpalatability) provide a framework to study plastic behavioural responses. If we combine the size threshold and palatability hypothesis, three testable predictions can arise: (1) tadpoles should employ size as a predator-refuge strategy, and then small tadpoles should be vulnerable to predators; (2) palatable tadpoles should be vulnerable to predators; (3) *R. spinulosa* tadpoles are unpalatable, and then they should be protected from engulfer predators such as dragonfly larvae; (4) tadpoles should reduce their activity only when predators involve a risk for them.

## Materials and methods

### Field studies

We sampled a total of 18 wetlands in four localities located in Nahuel Huapi National Park, Patagonia, Argentina. Localities were: Bernal, six wetlands; Ñirihuau, four wetlands; Ñireco, four wetlands; and western San Carlos de Bariloche city, four wetlands. Depth of water bodies varied from 15 cm to 2 m (Table 1). We employed dip-net sweeps (net dimensions 36 cm × 25 cm; 5 mm mesh) at different microhabitats in each wetland (Schaffer et al., 1994).

Sixteen of the wetlands were shallow temporary water bodies and only two were permanent wetlands (Table 1). The temporary wetlands had variable hydroperiods starting in autumn and extending until early summer. Predator and anuran assemblages for each wetland are shown in Table 2. The most frequent anuran species encountered in our surveys was *P. bufoninum* (occurred in 13 wetlands), followed by *P. thaul* (six wetlands), and the less common species was *R. spinulosa* (four wetlands). Tadpoles of

*P. thaul* always co-occurred with several species of predaceous insects (Table 2). *P. bufoninum* tadpoles were found in wetlands with variable richness of predaceous insects. Finally, *R. spinulosa* (relatively uncommon in the study area) was found in wetlands that differ greatly in predator species composition (Table 2). The most frequent and abundant predators in the wetlands were two small species (the backswimmer *Notonecta vereertbruggheni* (maximum size 15 mm) Notonectidae, and the beetle larvae of *Rhantus* sp. (maximum size 30 mm) Dytiscidae), and two big species (the water bug *Belostoma bifoveolatum* (maximum size 35 mm) Belostomatidae, and the dragonfly larvae *Rhionaeschna variegata* (maximum size 50 mm) Aeshnidae).

### Laboratory experiments

#### Prey stock

For all the experiments, we used a stock of tadpoles reared from eggs collected in natural ponds. We collected four clutches from each of the species.

**Table 1** Location, elevation, maximum area, and depth of wetlands sampled during spring-summer 2005–2008

Wetland	Geographic location	Elevation in m	Area (m <sup>2</sup> )	Depth (m)
Teleférico	41° 07'S; 71° 22'W	816	80	1.7
Fantasma	41° 05'S; 71° 27'W	794	10000	2
Mallin Pinar de Festa	41° 07'S; 71° 23'W	830	13	0.4
Virgen de las Nieves <sup>a</sup>	41° 08'S; 71° 24'W	–	–	1
Ñirihuau 1	41° 05' 09"S; 71° 10' 59"W	771	1000	0.7
Ñirihuau 2	41° 05' 09"S; 71° 10' 03"W	771	6837	0.6
Ñirihuau 3	41° 05' 18.9"S; 71° 10' 52.2"W	771	15.1	0.6
Ñirihuau 4	41° 05' 09"S; 71° 10' 05"W	777	651.5	0.5
Bernal 1	41° 08' 49.28"S; 71° 11' 0.07"W	837	556	0.38
Bernal 2	41° 08' 49.24"S; 71° 11' 0.07"W	837	234	0.45
Bernal 3	41° 08' 49.28"S; 71° 11' 0.09"W	838	543	0.46
Bernal 4	41° 08' 38.08"S; 71° 10' 36.81"W	838	87	0.4
Bernal 5	41° 08' 33.94"S; 71° 10' 21.17"W	844	33	0.3
Bernal 6	41° 08' 33.07"S; 71° 10' 25.46"W	837	15	0.4
Mallin Ñireco <sup>a</sup>	41° 10' 53.03"S; 71° 19' 14.29"W	899	1000	0.88
Ñireco 1	41° 10' 53.03"S; 71° 19' 14.29"W	906	240	1.4
Ñireco 2	41° 10' 52.78"S; 71° 18' 56.62"W	906	< 20	0.3
Ñireco 3	41° 10' 50.70"S; 71° 19' 09.55"W	906	10	0.15

The four-first wetlands occur in San Carlos de Bariloche surrounding

<sup>a</sup> Permanent wetland

**Table 2** Assemblages of tadpoles and aquatic insect predators found in four localities of the Nahuel Huapi National Park

Wetland	Aquatic insects	Anuran species
Teleferico	<i>Rhantus</i> sp.	Pt
	<i>Tropisternus</i> sp.	
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
	<i>Notonecta virescens</i>	
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Cyanallagma interruptum</i>	
	<i>Rhionaeschna variegata</i>	
Fantasma	<i>Rhantus</i> sp.	Pt
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
	<i>Lancetes</i> sp.	
	<i>Cyanallagma interruptum</i>	
Mallin Pinar de Festa	<i>Rhantus</i> sp.	Pt
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
Virgen de las Nieves	<i>Rhantus</i> sp.	Pt + Pb
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Cyanallagma interruptum</i>	
	<i>Erythrodiplax</i> sp.	
Ñirihuau 1	<i>Rhantus</i> sp.	Pt + Pb
	<i>Lancetes</i> sp.	
	<i>Tropisternus</i> sp.	
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
	<i>Cyanallagma interruptum</i>	
	<i>Rhionaeschna variegata</i>	
Ñirihuau 2	<i>Rhantus</i> sp.	Pt + Pb
	<i>Lancetes</i> sp.	
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
Ñirihuau 3	<i>Rhantus</i> sp.	Pb
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
	<i>Cyanallagma interruptum</i>	
Ñirihuau 4	<i>Rhantus</i> sp.	Pb
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	
Bernal 1	<i>Rhantus</i> sp.	Pb
Bernal 2	<i>Rhantus</i> sp.	Pb
Bernal 3	<i>Rhantus</i> sp.	Pb

**Table 2** continued

Wetland	Aquatic insects	Anuran species
Bernal 4	<i>Rhantus</i> sp.	Pb
Bernal 5	NP	Pb
Bernal 6	<i>Rhantus</i> sp.	Pb
Mallin Ñireco	<i>Rhantus</i> sp.	Pb + Rs
	<i>Lancetes</i> sp.	
	<i>Tropisternus</i> sp.	
	<i>Notonecta viriscens</i>	
	<i>Notonecta vereertbruggheni</i>	
Ñireco 1	<i>Belostoma bifoveolatum</i>	Pb + Rs
	<i>Cyanallagma interruptum</i>	
	<i>Erythrodiplax</i> sp.	
	<i>Rhionaeschna variegata</i>	
Ñireco 2	<i>Rhantus</i> sp.	Rs
Ñireco 3	NP	Rs

All wetlands were surveyed during spring and summer (2005–2008)

Pt, *P. thaul*; Pb, *Pleurodema bufoninum*; Rs, *Rhinella spinulosa*; NP, no predators were found

*P. thaul* clutches were collected from Laguna Fantasma (San Carlos de Bariloche locality); *P. bufoninum* and *R. spinulosa* clutches were collected from Mallin Ñireco wetland. These wetlands all had four predator species and similar species richness and abundance of predators (Jara, unpublished data); thus, we assumed equal predation risks across the wetlands (Table 2). After the clutches were collected, they were placed in separated containers (15 l). When tadpoles hatched, they were transferred to 9 l containers and fed every other day with a mix of algae culture (*Scenedesmus* sp. + *Clamydomonas* sp.) and freshwater fish food (<sup>®</sup>VitaFish).

#### Predator stock

We collected four of the most common tadpole predators from natural ponds (see above): larvae of *Rhantus* sp., adults of *Notonecta vereertbruggheni*, adults of *Belostoma bifoveolatum* and larvae of *R. variegata*. Before the experiment started, predators were individually placed in plastic tubs (250 ml) for 24 h and fed one mosquito larvae each.

## Survival rate experiment

To address whether survival rate differed among tadpole species, tadpole size, and predator type, we exposed the three tadpole species at two different sizes [*P. thaul*, total length:  $14.08 \pm 0.12$  mm (26–27 Gosner stages, Gosner (1960) and  $31.5 \pm 0.5$  mm (stages 31–32); *P. bufoninum*,  $11.1 \pm 0.2$  mm (stages 26–27) and  $32 \pm 0.28$  mm (stages 30–32); *R. spinulosa*,  $11.60 \pm 0.09$  mm (stages 24–26) and  $22.9 \pm 0.18$  mm (stages 34–36)] to four different predators in a three-way factorial design ( $2 \times 3 \times 4$ ) totalling 24 treatments. Because survivorship was always 100% in the control non-predator treatment, we did not include this treatment in the analysis. Each treatment combination (tadpole size/tadpole species/predator) was replicated five times resulting in 120 experimental units (bowls). The experiment was conducted in plastic bowls with 1 l capacity, filled with dechlorinated water. Each bowl contained one predator and five tadpoles. These densities and bowls have been used in previous experiments (Jara & Perotti, 2009); all experiments were initiated on the same day. The density of prey used are similar to what is found in regional wetlands during late spring, when ponds begin to dry up. The predator treatments were, backswimmer [*N. vereertbruggheni*,  $12.24 \pm 0.62$  mm (mean  $\pm$  SD)], beetle larvae (*Rhantus* sp.,  $25.21 \pm 1.76$  mm), adult water bugs (*B. bifoveolatum*,  $25.73 \pm 1.04$  mm), and dragonfly larvae (*R. variegata*,  $34.93$  mm  $\pm$  1.77 mm). The experiment was run for 2 h in a room with controlled photoperiod (12:12 L:D) and artificial light provided by two fluorescent lamps (Philips daylight, TLT 40 W/54RS) at an average room temperature of  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . At the end of the experiment the number of surviving tadpoles in each bowl was recorded. Survivorship was analyzed with a three-way ANOVA test for a balanced design with fixed factors. Bonferroni *t* test were performed for all pairwise multiple comparisons.

## Behavioural response of tadpoles to predators

To address whether behavioural responses are predator-specific, and if they differ with tadpole size and species, we evaluated whether tadpole's activity changed when they were exposed to chemical and visual-tactile cues from common predators. The experiments were conducted in the same conditions, as survival rate experiments detailed above.

The experiment consisted of a  $3 \times 2 \times 5$  factorial design, with tadpole species (*P. thaul*, *P. bufoninum* and *R. spinulosa*), tadpole size (small and large) and predator type (control, beetle larvae, backswimmer, water bug and dragonfly larvae), as factors. Control predator treatment consisted of empty predator cages to quantify tadpole activity when no predation cues were present (Relyea & Werner, 1999; Schmidt & Amézquita, 2001; Laurila et al., 2006; Jara & Perotti, 2009). Each treatment combination was replicated 10 times (300 replicates in total). Trials for activity were run in 1.5 l plastic tubs ( $24 \times 12 \times 5$  cm) filled with aged tap water and containing a plastic predator cage and one tadpole. The predator cages were cylindrical (5 cm diameter  $\times$  10 cm long), constructed with plastic mesh and were large enough for predator to move allowing tadpoles to detect chemical, visual and tactile cues from predators. The predator cage was positioned at one end of the tub and contained one predator (or two in the case of backswimmer and beetle larvae due to the small size of these predators). Before the experiment was initiated, tadpoles and predators were acclimated in tubs for 30 min. Previous observations on activity indicated that observers do not alter activity rates. Thus, we quantified activity by standing over the tubs and counting the number of tadpoles moving in each tub. Activity was recorded six times per tadpole. Each interval was 20 s, and then the data were expressed as the proportion of total observations (six) per tub (Martin & Bateson, 1993). A tadpole was considered active if it was either swimming or moving its tail and scored as inactive when it was completely motionless. Tadpoles were never used in more than one trial. Tadpole activity was analyzed using a three-way ANOVA for the fixed effects of tadpole species, tadpole size, predators, and their interactions. When the ANOVA rejected the null hypothesis of no mean difference among activity, we tested if predator treatments differed from the control using Bonferroni *t* tests.

## Results

### Survival rate experiment

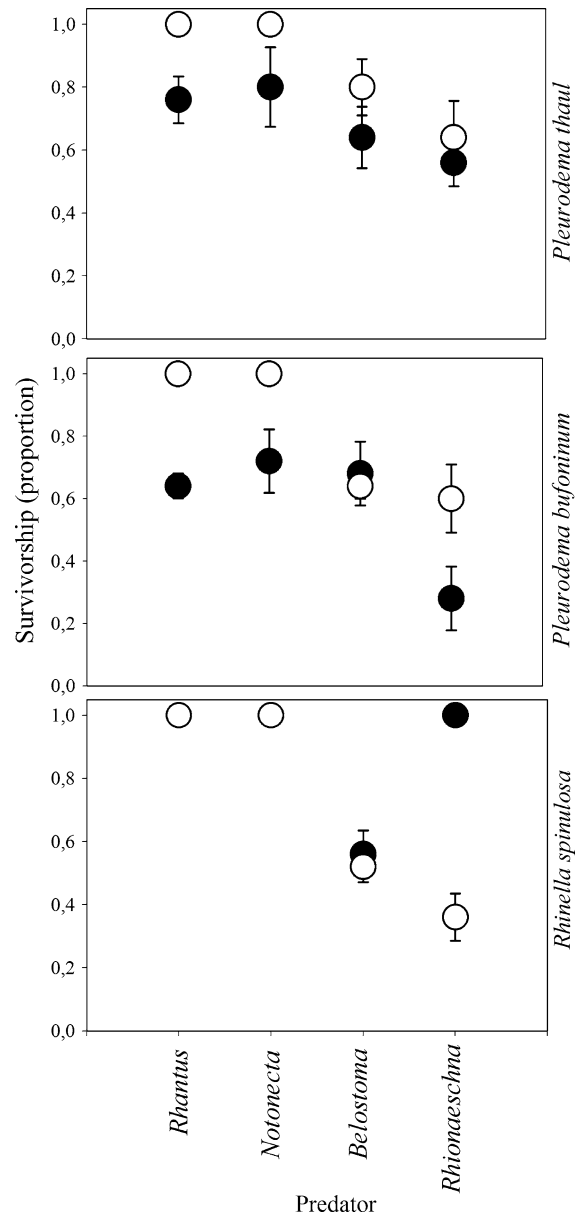
Tadpole survival was affected by tadpole species, tadpole size and predator species (Table 3; Fig. 1).



**Table 3** Three-way ANOVA to evaluate the effect of tadpole species, tadpole size and predator on tadpole survival

Source of variation	df	F	P
SPP	2	7.96	<0.001
SIZE	1	10.90	0.001
PRED	3	43.66	<0.001
SPP × SIZE	2	21.61	<0.001
SPP × PRED	6	3.67	0.002
SIZE × PRED	3	7.20	<0.001
SPP × SIZE × PRED	6	4.55	<0.001

There were significant interactions between tadpole species and tadpole size, tadpole species and predator, and tadpole size and predator. In addition, there was a significant interaction among tadpole size, tadpole species, and predator (Table 3). Mean comparisons using Bonferroni *t* test revealed significant differences in survivorship among anuran species. *P. thaul* and *R. spinulosa* had greater survivorship than *P. bufoninum*, when they were offered to the different predators (*P. thaul* vs. *P. bufoninum*  $t = 2.44$ ,  $P < 0.04$ ; *P. bufoninum* vs. *R. spinulosa*,  $t = 3.95$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 1). In addition, there was a significant difference between large and small tadpoles survivorship across anuran species and predator treatments (mean small tadpoles survivorship = 0.72, SE = 0.03; mean large tadpole survivorship = 0.79, SE = 0.03) (Bonferroni *t* test, large vs. small  $t = 3.303$ ,  $P = 0.001$ ) (Fig. 1). The Bonferroni *t* test also revealed significant differences among predator treatments. In general, survivorship of tadpoles when they were exposed to *Notonecta* and *Rhantus* predators was higher, and significantly different from the other predator treatments (*Notonecta* vs. *Rhionaeschna*,  $t = 8.08$ ,  $P < 0.001$ ; *Notonecta* vs. *Belostoma*,  $t = 7.19$ ,  $P < 0.001$ ; *Rhantus* vs. *Rhionaeschna*,  $t = 8.90$ ,  $P < 0.001$ ; *Rhantus* vs. *Belostoma*,  $t = 8.00$ ,  $P < 0.001$ , *Notonecta* vs. *Rhantus*,  $t = 0.81$ ,  $P = 1.0$ ; *Belostoma* vs. *Rhionaeschna*,  $t = 0.89$ ,  $P = 1.0$ , Fig. 1). Tadpoles exposed to *Belostoma* and *Rhionaeschna* exhibited decreased survivorship. In addition, *Rhantus*, *Notonecta* and *Rhionaeschna* did not consume small *R. spinulosa* tadpoles (Fig. 1). We observed that 100% of smaller *R. spinulosa* tadpoles were rejected after they were caught by *Rhantus*, *Notonecta* and *Rhionaeschna*.



**Fig. 1** Survival of tadpoles (mean  $\pm$  SE,  $N = 5$  for each treatment combination) exposed to four predators: backswimmer (*Notonecta*), beetle larvae (*Rhantus*), water bug (*Belostoma*) and dragonfly (*Rhionaeschna*). Feeding trial consisted of five tadpoles (small or large) offered to one individual predator over a 2 h period (filled circles small tadpoles, open circles large tadpoles)

After *Rhantus* and *Rhionaeschna* attacked and released *R. spinulosa* tadpoles they quickly began cleaning their mouthparts (with the first pair of legs).

Tadpole behavioural response to predators

Tadpole activity was affected by tadpole species, tadpole size and predator species (Table 4; Fig. 2).

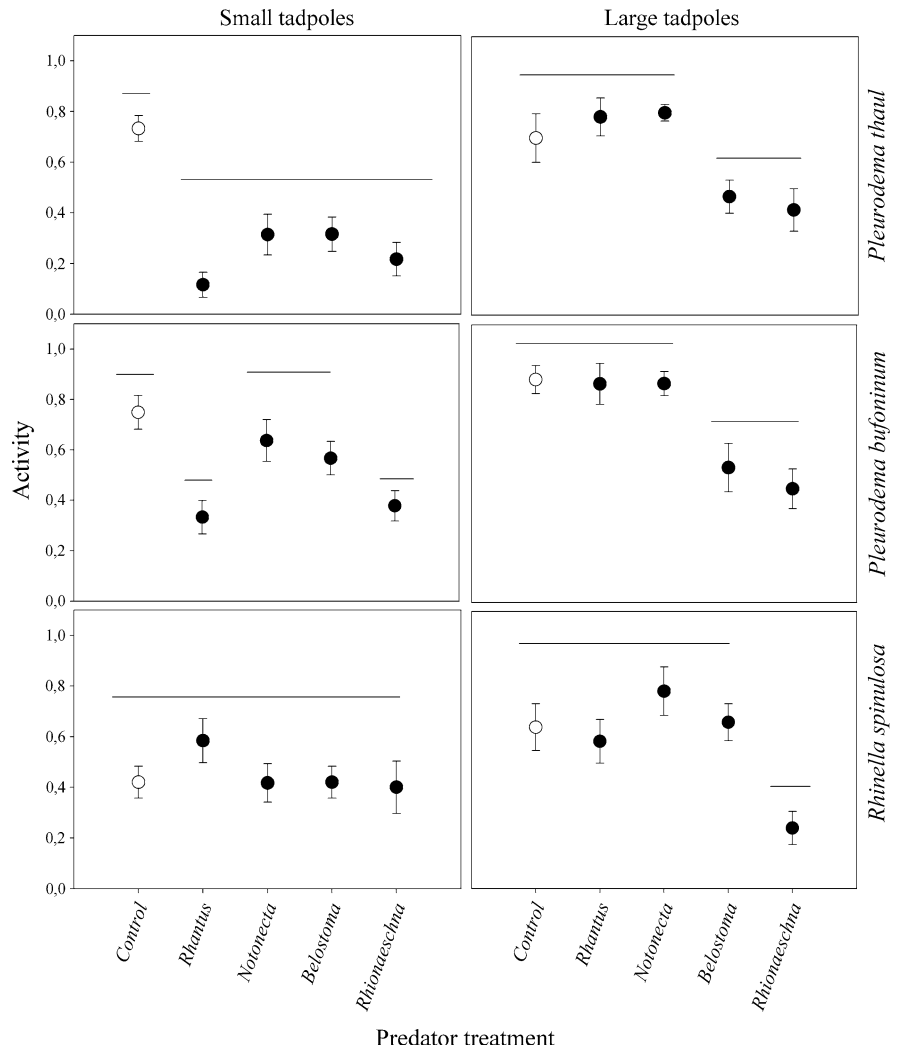
**Table 4** Three-way ANOVA to evaluate the effect of tadpole species, tadpole size and predator on tadpole activity

Source of variation	df	F	P
SPP	2	10.94	<0.001
SIZE	1	55.09	<0.001
PRED	4	16.99	<0.001
SPP × SIZE	2	3.08	0.05
SPP × PRED	8	1.89	0.06
SIZE × PRED	4	7.86	<0.001
SPP × SIZE × PRED	8	3.48	<0.001

There were significant interactions between tadpole size and anuran species, tadpole size and predator. We observed significant interaction among all factors (Table 4).

Mean comparisons using Bonferroni *t* test revealed significant differences in activity rates of anuran species. *P. thaul* tadpoles were found less active than *P. bufoninum* tadpoles, when they were exposed to predators (*P. thaul* vs. *P. bufoninum*,  $t = 3.85$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2). When comparing tadpole size across anuran species and predator type, large tadpoles were more active than small tadpoles (mean small tadpoles activity = 0.704, SE = 0.0308; mean large tadpoles activity = 0.989, SE = 0.0351) (Bonferroni *t* test, large vs. small  $t = 8.157$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2). When comparing activity across each

**Fig. 2** Proportion of tadpoles active (mean ± SE,  $N = 10$  for each treatment combination) at two sizes (filled circles small tadpoles, open circles large tadpoles) exposed to four predator cues (visual, chemical and tactile) and control. Line over means indicate homogenous groups according Bonferroni *t* tests



predator level, some differences among species and tadpole sizes were revealed. There were significant differences among anuran species when they were exposed to *Rhantus* and *Notonecta* predators (Bonferroni *t* test at *Rhantus* predator level, *R. spinulosa* vs. *P. bufoninum*,  $t = 3.17$ ,  $P = 0.005$ ; *P. bufoninum* and *P. thaul*,  $t = 3.17$ ,  $P = 0.005$ ) (Bonferroni *t* test at *Notonecta* predator level, *R. spinulosa* vs. *P. thaul*,  $t = 4.36$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2). Small tadpoles of *P. bufoninum* and *P. thaul* were significantly less active than large tadpoles when they were exposed to *Rhantus* and *Notonecta* predators (Bonferroni *t* test, *Rhantus*, large vs. small  $t = 4.14$ ,  $P < 0.001$ ; *Notonecta*, large vs. small  $t = 8.40$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

## Discussion

### Prey size and predation by aquatic insects

The impact of insect predators on anuran populations can be substantial and varies among species. For example, our results confirm that notonectids can impact only a relatively short period of larval life when tadpoles are small (Cronin & Travis, 1986). In ponds where several tadpole sizes coexist (different cohorts/different species), predators with varying feeding strategies could impose different risks for each size-class and could strongly affect the tadpole size-structure (Cronin & Travis, 1986). The risk of predation imposed by some insect predators that are capable of feeding on a wide range of size classes, such as dragonflies, make it difficult for tadpoles to escape predation pressure by growing large. In such cases, in order to avoid predation tadpoles could use other strategies such as reducing the activity level (as that shown in this study and in the works by Skelly & Werner, 1990 and Benard, 2004). Predators in this study had different impacts on the survival of tadpole species. Notonectids and beetle larvae seem to impose less risk of predation because they consumed only small tadpoles of *Pleurodema* species. Water bugs and dragonflies consumed most of the tadpole species and were the only predators that could eat large tadpoles. These invertebrate predators can reach large prey sizes, and thus increase the range of prey that they can access (Formanowicz, 1986; Jara, 2008).

### Tadpole palatability

Several studies using a single prey species, but different predators, revealed that some predators might find a species palatable, whereas others might find them unpalatable (Petranka, 1983; Kats et al., 1988; Gunzburger & Travis, 2005). *R. spinulosa* was not palatable for almost all the predators studied. The water bug *B. bifoveolatum* was observed eating toad tadpoles and discarding intact epithelial tissue (skin) after consumption (Jara & Perotti, 2009). This kind of feeding behaviour protects predators from toxins concentrated in the skin of prey (Peterson & Blaustein, 1992). It is known that toxins that are concentrated in the skin are less effective on species that suck body fluids from prey (Wassersug, 1973; Wilbur, 1997; Benard & Fordyce, 2003). The notonectids used in our study exhibited a feeding behaviour characterized by sucking the fluid of pre-digested prey similar to that used by belostomatids. However, we observed that notonectids that captured toad tadpoles rejected them immediately after their capture. Similarly, we observed that beetle larvae found toad tadpoles unpalatable; however, this result differs from that observed in similar insect predators, which find tadpoles of other bufonids species palatable (Relyea, 2001b; Benard & Fordyce, 2003). Then, the importance of the chemical defences in tadpoles not always represents the best strategy of protection from predators. Gunzburger & Travis (2005) proposed that the effectiveness of unpalatability might depend on the ensemble of predators and alternative prey present in the habitat, and this could be the case in our study (Table 2).

### Predation risk and behavioural response

In agreement with other studies (Sih, 1987; Peckarsky, 1996; Relyea, 2001b), we found that the behavioural responses of a given prey to different predators were generally correlated to the predation risk of these predators. For example, we found that unpalatable small tadpoles of *R. spinulosa* did not alter their activity in the presence of any of the predators. However, *B. bifoveolatum* consumed both small and large *Rhinella* tadpoles (all unpalatable), showing that toad tadpoles seem to have few defences against this predator. One potential explanation for this phenomenon could be that *B. bifoveolatum* is an

uncommon predator in the toad tadpole's natural habitat (Jara & Perotti, 2009). We observed that in natural conditions toad tadpoles aggregate in shallow parts of the ponds without vegetation (where *Belostoma* are absent) (Jara et al., 2006). Thus, *R. spinulosa* tadpoles may not have developed an adaptive defence to this predator because encounters are infrequent. In the same way, tadpoles of the frogs *Ascaphus truei* and *Alytes muletensis* respond to predators with which they coexist but do not respond to predators with which they do not usually encounter (Feminella & Hawkins, 1994; Griffiths et al., 1998).

Large and palatable *R. spinulosa* tadpoles reduced their activity only in the presence of the effective dragonfly larvae predator (*Rhionaeschna variegata*), as it has been observed in other studies (Skelly & Werner, 1990; Semlitsch & Gavasso, 1992; Anholt et al., 1996; Perotti et al., 2006; Stav et al., 2007). Then, these changes in palatability during the ontogeny could reinforce the need to express alternative defences at different life stages.

Small tadpoles of *P. thaul* and *P. bufoninum* were more susceptible to predation and had a significantly reduced activity when they were exposed to predators. Similar results have been observed in other anuran species (Eklöv & Werner, 2000). Relyea (2003) concluded that tadpoles change their phenotypic strategy through ontogeny. In early and mid ontogeny (i.e., small and intermediate sizes), tadpoles alter their behaviour by hiding and reducing activity, but later in ontogeny (i.e., large sizes) they only alter their morphology.

Small tadpoles of *P. thaul* responded to all of the predators tested in our study; however, large tadpoles only responded to large predators (water bug and dragonfly). These findings suggest that large tadpoles are relatively more active than small tadpoles because they are not at risk when they are exposed to small predators such as beetle larvae and backswimmers. Thus, when tadpoles reach a size that makes them no longer vulnerable to specific predators, their activity rates increase, indicating that behavioural responses may be an adaptive response at small sizes. A reasonable hypothesis to mitigate the risk of predation in *P. thaul* could be to accelerate growth during early stages in order to reach a size that reduces predation risk from small predators (size threshold hypothesis). *P. bufoninum* tadpoles appear to be more sensitive to predators and more active than *P. thaul*

tadpoles. *P. bufoninum* tadpoles are distributed mainly in wetlands found in desert regions of the Patagonian steppe, where the diversity of predator insects is relatively low. Some authors have emphasized that species inhabiting ephemeral pools in desert landscapes generally tend to be superior competitors, but very susceptible to predation (Dayton & Fitzgerald, 2001). More studies are necessary to confirm whether *P. bufoninum* is a superior competitor, but more susceptible to predation than *P. thaul*, following the patterns observed for ephemerally adapted species.

#### Behavioural response of *Pleurodema* and *Rhinella* tadpoles

The lack of a significant response of *R. spinulosa* tadpoles to predators observed in this study may be related to the presence of a primary defence mechanism (chemical deterrents) (Jara & Perotti, 2009); similar results were observed by Kiesecker et al. (1996), who found that *Bufo boreas* tadpoles did not respond to predators that find them unpalatable.

We found that *Pleurodema* tadpoles exhibit considerable behavioural responses to predators. *P. thaul* and *P. bufoninum* tadpoles showed similar behavioural responses, as it has been previously observed in some ranid and hylid species (e.g. Relyea, 2001a, b; Richardson, 2001; Lane & Mahony, 2002; Vonesh, 2003; Benard, 2004; Kraft et al., 2006; Richter-Boix et al., 2008).

Skelly (1997) established that tadpoles inhabiting permanent ponds are less active than tadpoles in temporary ponds. However, according with our results in temporary ponds, the predation pressure imposed by insect predators affects tadpole behaviour, particularly the time they spend moving. The anuran species studied inhabit temporary habitats and their tadpoles were more active when predators were absent. Particularly, *Pleurodema* species were the most susceptible ones to the behavioural changes, but more studies in this group of species are required to analyze patterns and compare different lineages. Moreover, other responses to predators, such as refuge use and morphological changes, are needed to understand whether morphology and behavioural responses are phylogenetic signals or plastic responses in this poorly known amphibian clade.

The differences we found between activity patterns and tadpole survivorship in response to different

predators might reveal a history of co-evolution between the anurans and predators in their natural environments. The reduction in the activity rate is an adaptive behaviour that makes prey less noticeable to predators. It could be interpreted as a reduction of predator encounters (Sih, 1992; Skelly, 1994; Relyea, 2001b), but it could also be associated with costs or problems that limit the efficacy of plasticity, for example, a reduction in the foraging rate, which ultimately leads to small sizes, with costs at juvenile stages (Skelly & Werner, 1990; Skelly, 1992; DeWitt, 1998; Relyea, 2002). We conclude that the behavioural responses of these anuran species are predator-specific and related to the risk imposed by each predator. The plastic responses observed in these Patagonian anurans could be important in determining species distribution and ultimately in shaping these anuran communities.

**Acknowledgements** This research was performed under the institutional Animal Care guidelines established by Argentinean animal protection law and Administración de Parques Nacionales, Argentina. Animals for this study were collected with the permission of Administración de Parques Nacionales, Argentina. We thank J. Muzon and S. Mazzucconi for identifying insect species. We are grateful to an anonymous reviewer and M. Tejedo for all comments that improved this manuscript. We also thank G. Dayton and D. Saenz for their assistance with editing and providing useful comments and suggestions. This work was supported by Universidad Nacional del Comahue (B940), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (PIP 6451) and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-13550).

## References

- Allan, J. D., A. S. Flecker & N. L. McClintock, 1987. Prey size selection by carnivorous stoneflies. *Limnology and Oceanography* 32: 864–872.
- Anholt, B. R., D. K. Skelly & E. E. Werner, 1996. Factors modifying antipredator behaviour in larval toads. *Herpetologica* 52: 301–313.
- Azevedo-Ramos, C., M. Van Sluys, J.-M. Hero & W. E. Magnusson, 1992. Influence of tadpole movement on predation by odonate naiads. *Journal of Herpetology* 26: 335–338.
- Benard, M. F., 2004. Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 651–673.
- Benard, M. F. & J. A. Fordyce, 2003. Are induced defenses costly? Consequences of predator-induced defenses in western toads, *Bufo boreas*. *Ecology* 84: 68–78.
- Brendonck, L., E. Michels, L. De Meester & B. Riddoch, 2002. Temporary pools are not 'enemy-free'. *Hydrobiologia* 486: 147–159.
- Brockelman, W. Y., 1969. An analysis of density effects and predation in *Bufo americanus* tadpoles. *Ecology* 50: 632–644.
- Caldwell, J. P., J. H. Thorp & T. O. Jervy, 1980. Predator-prey relationships among larval dragonflies, salamanders, and frogs. *Oecologia* 46: 285–289.
- Calef, G. W., 1973. Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. *Ecology* 54: 741–758.
- Cronin, J. T. & J. Travis, 1986. Size-limited predation on larval *Rana areolata* (Anura: Ranidae) by two species of backswimmer (Insecta: Hemiptera: Notonectidae). *Herpetologica* 42: 171–174.
- Crump, M. L., 1984. Ontogenetic changes in vulnerability to predation in tadpoles of *Hyla pseudopuma*. *Herpetologica* 40: 265–271.
- Dayton, G. H. & L. A. Fitzgerald, 2001. Competition, predation, and the distribution of four desert anurans. *Oecologia* 129: 430–435.
- De Witt, T. J., 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity: tests with predator-induced morphology and life-history in a freshwater snail. *Journal of Evolutionary Biology* 11: 465–480.
- Eklöv, P. & E. E. Werner, 2000. Multiple predator effects on size-dependent behavior and mortality of two species of anuran larvae. *Oikos* 88: 250–258.
- Feminella, J. W. & C. P. Hawkins, 1994. Tailed frog tadpoles differentially alter their feeding behavior in response to non-visual cues from four predators. *Journal of North American Benthological Society* 13: 310–320.
- Formanowicz, D. R. Jr., 1986. Anuran tadpole/aquatic insect predator-prey interactions: tadpole size and predator capture success. *Herpetologica* 42: 367–373.
- Formanowicz, D. R. Jr., & E. D. Brodie Jr., 1982. Relative palatabilities of members of a larval amphibian community. *Copeia* 1982: 91–97.
- Gosner, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos on larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183–190.
- Griffiths, R. A., L. Schley, P. E. Sharp, J. L. Dennis & A. Román, 1998. Behavioural responses of Mallorcan midwife toad tadpoles to natural and unnatural snake predators. *Animal Behaviour* 55: 207–214.
- Gunzburger, M. S. & J. Travis, 2005. Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *Journal of Herpetology* 39: 547–571.
- Hambright, K. D., 1991. Experimental analysis of prey selection by largemouth bass: role of predator mouth width and prey body depth. *Transactions of the American Fisheries Society* 120: 500–508.
- Heyer, W. R., R. W. McDiarmid & D. L. Weigmann, 1975. Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica* 7: 100–111.
- Jara, F. G., 2008. Tadpole-odonate larvae interactions: influence of body size and diel rhythm. *Aquatic Ecology* 42: 503–509.
- Jara, F. G. & M. G. Perotti, 2006. Variación ontogenética en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus* Philippi, 1902 (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología* 19: 37–42.
- Jara, F. G. & M. G. Perotti, 2009. Toad tadpole responses to predator risk: Ontogenetic change between constitutive and inducible defenses. *Journal of Herpetology* 43: 82–88.

- Jara, F. G., M. Lozada & C. A. Úbeda, 2006. *Bufo spinulosus papillosus* tadpole behavior. *Herpetological Review* 37: 201.
- Johnson, E. B., P. Bierzychudek & H. H. Whiteman, 2003. Potential of prey size and type to affect foraging asymmetries in tiger salamander (*Ambystoma tigrinum nebulosum*) larvae. *Canadian Journal of Zoology* 81: 1726–1735.
- Kats, L. B., J. W. Petranka & A. Sih, 1988. Antipredator defences and the persistence of amphibian larvae with fishes. *Ecology* 69: 1865–1870.
- Kiesecker, J. M., D. P. Chivers & A. R. Blaustein, 1996. The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. *Animal Behaviour* 52: 1237–1245.
- Kishida, O. & K. Nishimura, 2005. Multiple inducible defenses against multiple predators in the anuran tadpole, *Rana pirica*. *Evolutionary Ecology Research* 7: 619–631.
- Kishida, O., Y. Mizuta & K. Nishimura, 2006. Reciprocal phenotypic plasticity in a predator–prey interaction between larval amphibians. *Ecology* 87: 1599–1604.
- Kraft, P. G., C. E. Franklin & M. W. Blows, 2006. Predator-induced phenotypic plasticity in tadpoles: extension or innovation? *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1813–1818.
- Lane, S. J. & M. J. Mahoney, 2002. Larval anurans with synchronous and asynchronous development periods: contrasting responses to water reduction and predator presence. *Journal of Animal Ecology* 71: 780–792.
- Laurila, A., S. Pakkasmaa & J. Merila, 2006. Population divergence in growth rate and antipredator defences in *Rana arvalis*. *Oecologia* 147: 585–595.
- Lawler, S. P., 1989. Behavioral responses to predation and predation risk in four species of larval anurans. *Animal Behaviour* 38: 1039–1047.
- Martin, P. & P. Bateson, 1993. *Measuring behaviour, an introductory guide*. Cambridge University Press, Cambridge.
- McIntyre, P. B., S. Baldwin & A. S. Flecker, 2004. Effects of behavioral and morphological plasticity on risk of predation in a neotropical tadpole. *Oecologia* 141: 130–138.
- Miner, B. G., S. E. Sultan, S. G. Morgan, D. K. Padilla & R. A. Relyea, 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 685–692.
- Peckarsky, B. L., 1996. Alternative predator-avoidance syndromes of stream-dwelling mayflies. *Ecology* 77: 1888–1905.
- Perotti, M. G., L. A. Fitzgerald, L. Moreno & M. Pueta, 2006. Behavioral responses of *Bufo arenarum* tadpoles to odonate naiad predation. *Herpetological Conservation and Biology* 1: 117–120.
- Peters, R. H., 1983. *The ecological implications of body size*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Peterson, J. A. & A. R. Blaustein, 1992. Relative palatabilities of anuran larvae to natural aquatic insect predators. *Copeia* 1992: 577–584.
- Petranka, J. W., 1983. Fish predation: a factor affecting the spatial distribution of a stream-dwelling salamander. *Copeia* 1983: 624–628.
- Relyea, R. A., 2001a. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology* 82: 523–540.
- Relyea, R. A., 2001b. The relationship between predation risk and antipredator responses in larval anurans. *Ecology* 82: 541–554.
- Relyea, R. A., 2002. Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues, and connections to predator-induced plasticity. *Ecological Monograph* 72: 523–540.
- Relyea, R. A., 2003. Predators come and predators go: the reversibility of predator-induced traits. *Ecology* 84: 1840–1848.
- Relyea, R. A. & E. E. Werner, 1999. Quantifying the relationship between predator-induced behavior and growth performance in larval anurans. *Ecology* 80: 2117–2124.
- Richards, S. J. & C. M. Bull, 1990. Size-limited predation on tadpoles of three Australian frogs. *Copeia* 1990: 1041–1046.
- Richardson, J. L., 2001. A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators. *Behavioral Ecology* 12: 51–58.
- Richter-Boix, A., G. A. Llorente & A. Montori, 2008. A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiologia* 583: 43–56.
- Schaffer, H. B., R. A. Alford, B. D. Woodward, S. J. Richards, R. G. Altig & C. Gascon, 1994. Quantitative sampling of amphibian larvae. In Heyer, W. R., M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek & M. S. Foster (eds), *Measuring and Monitoring Biological Diversity Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington: 130–141.
- Schmidt, B. R. & A. Amézquita, 2001. Predator-induced behavioral responses: tadpoles of neotropical frog *Phyllomedusa tarsius* do not respond to all predators. *Herpetological Journal* 11: 9–15.
- Semlitsch, R. D. & S. Gavasso, 1992. Behavioral responses of *Bufo bufo* and *Bufo calamita* to chemical cues of vertebrate and invertebrate predators. *Ethology, Ecology, and Evolution* 4: 165–173.
- Sih, A., 1987. Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview. In Sih, A. & W. C. Kerfoot (eds), *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover: 203–224.
- Sih, A., 1992. Integrative approaches to the study of predation: general thoughts and a case study on sunfish and salamander larvae. *Annals of Zoology Fennici* 29: 183–198.
- Skelly, D. K., 1992. Field evidence for a cost of behavioral antipredator response in a larval amphibian. *Ecology* 73: 704–708.
- Skelly, D. K., 1994. Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation. *Animal Behaviour* 47: 465–468.
- Skelly, D. K., 1995. A behavioural trade-off and its consequences for the distribution of *Pseudacris* treefrog larvae. *Ecology* 76: 150–164.
- Skelly, D. K., 1996. Pond drying, predators and the distribution of *Pseudacris* tadpoles. *Copeia* 1996: 599–605.
- Skelly, D. K., 1997. Tadpole communities. *American Science* 85: 36–45.
- Skelly, D. K. & E. E. Werner, 1990. Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. *Ecology* 71: 2313–2322.

- Smith, D. C., 1983. Factor controlling tadpole populations of the chorus frog (*Pseudacris triseriata*) on Isle Royale, Michigan. *Ecology* 64: 501–510.
- Stav, G., B. P. Kotler & L. Blaustein, 2007. Direct and indirect effects of dragonfly (*Anax imperator*) nymphs on green toad (*Bufo viridis*) tadpoles. *Hydrobiologia* 579: 85–93.
- Takahara, T., Y. Kohmatsu, A. Maruyama & R. Yamaoka, 2003. Effects of chemical cues on tadpole survival. *Ecological Research* 18: 793–796.
- Teplitsky, C. & A. Laurila, 2007. Flexible defence strategies: competition modifies investment in behavioral vs. morphological defences. *Ecology* 88: 1641–1646.
- Travis, J., W. H. Keen & J. Julianna, 1985. The role of relative body size in a predator–prey relationship between dragonfly naiads and larval anurans. *Oikos* 45: 59–65.
- Urban, M. C., 2007. Predator size and phenology shape prey survival in temporary ponds. *Oecologia* 154: 571–580.
- Van Buskirk, J., 2001. Specific induced responses to different predator species in anuran larvae. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 482–489.
- Vonesh, J. R., 2003. Sequential predation in a complex life-history: interactions among egg, larval, and post-metamorphic predators of the east African treefrog, *Hyperolius spinigularis*. PhD thesis. University of Florida: 131 pp.
- Wassersug, R. J., 1973. Aspects of social behavior in anuran larvae. In Vial, J. L. (ed.), *Evolutionary Biology of Anurans: Contemporary Research on Major Problems*. University of Missouri Press, Columbia: 273–297.
- Wassersug, R. J. & D. G. Sperry, 1977. The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology* 58: 830–839.
- Wilbur, H. M., 1997. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology* 78: 2279–2302.
- Wilson, D. S., 1975. The adequacy of body size as a niche difference. *American Naturalist* 109: 769–784.
- Woodward, B. D., 1983. Predator prey interactions and breeding pond use of temporary pond species in a desert anuran community. *Ecology* 64: 1549–1555.

## Toad Tadpole Responses to Predator Risk: Ontogenetic Change between Constitutive and Inducible Defenses

FABIÁN G. JARA<sup>1</sup> AND MARÍA G. PEROTTI

Laboratorio de Fotobiología, INIBIOMA (Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue),  
Quintral 1250, (8400) Bariloche, Río Negro, Argentina

**ABSTRACT.**—*Rhinella spinulosa* is a toad common in rivers, streams, and steppe wetlands where they face a variety of insect predators. *Rhinella spinulosa* tadpoles are known to be unpalatable to dragonfly naiads at some developmental stages. In this paper, we studied susceptibility of *R. spinulosa* tadpoles to predation by two species of predators, water bugs (*Belostoma bifoveolatum*, Belostomidae) with piercing-sucking mouth parts and dragonfly larvae (*Rhionaeschna variegata*, Aeshnidae) with chewing mouth parts. We conducted feeding trials to test the effectiveness of tadpole chemical defenses against water bugs. We also performed behavioral and choice experiments to study whether tadpole behavior influences their vulnerability to predators, and whether *R. variegata* has the capacity of discern between palatable (stages 38–45) and unpalatable tadpoles (stages 24–26). *Rhinella spinulosa* tadpoles, when fully palatable, responded by reducing their activity levels in the presence of dragonfly larvae but did not alter their behavior at unpalatable-early stages. Chemical defenses were not effective against the sucking predator (*B. bifoveolatum*) and no changes in tadpole activity were observed. Selectivity experiments revealed the ability of dragonfly larvae to distinguish between unpalatable and palatable tadpoles. Inducible (behavior) and constitutive (toxins) defenses observed in *R. spinulosa* tadpoles and the transition between them could result in an important survival mechanism in response to variable predator risk in the habitats in which they co-occur.

When prey are at risk of predation, they may display various defenses to avoid or reduce the risk of predation, thereby maximizing their fitness (Sih, 1980). In general, these defenses have been partitioned into fixed or constitutive defenses and induced or plastic defenses (Tollrian and Harvell, 1999). There is considerable evidence that individuals within prey species (depending on the species) may differ in their responses to predator chemical cues (kairomones) and predator density (Larsson and Dodson, 1993; Schoeppner and Relyea, 2005). Some evidence shows that some responses to predators are specific (Lawler, 1989; Schmidt and Amézquita, 2001) and can change during ontogeny (Anholt et al., 1996; Kats and Dill, 1998; Eklöv and Werner, 2000). Anuran larvae can respond to predator risk by reducing their activity or taking refuge (Skelly, 1994; Laurila, 2000). Commonly these responses occur when tadpoles are palatable to predators (Pearl et al., 2003; Rundio and Olson, 2003).

Presence of toxins as chemical defenses from predators, and concomitant unpalatability, has been suggested as a mechanism for the protection of eggs and larvae of many amphibian species (Brodie et al., 1978; Duellman and

Trueb, 1999; Zug et al., 2001). Predators that swallow tadpoles whole or suck out body fluids are less likely to be affected by tadpole toxins restricted to the skin than are predators that chew or bite tadpoles (Peterson and Blaustein, 1992). Cutaneous chemical defenses may encourage the latter to reject the prey after the attack, and in some circumstances, the predators can learn to avoid that type of prey (Kruse and Stone, 1984; Peterson and Blaustein, 1992).

Consequently, tadpoles as prey may face a variety of evolutionary trade-offs in defending themselves and subsequently may show different responses to different predators. Kats et al. (1988) found that larvae of amphibians that have evolutionary histories of living with predatory fishes are often unpalatable or display behavioral responses to fish chemical cues. It is known that early stages of toad tadpoles are unpalatable to several predators that chew their prey (Brodie et al., 1978; Brodie and Formanowicz, 1987; Jara and Perotti, 2006). Furthermore, unpalatable individuals apparently ignore predator signals and continue other fitness enhancing activities (e.g., feeding, Semlitsch and Gavasso, 1992; Kats and Dill, 1998). A few studies have shown that predators, like odonates or fish, avoid toxic tadpoles conferring an advantage on the survivorship of larvae (Kruse and Stone, 1984; Brodie and Formanowicz, 1987; Crossland, 2001). We found shifts in palatability

<sup>1</sup> Corresponding Author. E-mail: fjara@crub.uncoma.edu.ar



in *Rhinella [Bufo] spinulosa* throughout ontogeny, with smaller tadpoles unpalatable to chewing predators compared to larger tadpoles that are palatable (Jara and Perotti, 2006). Therefore, we expected that in presence of chewing predators palatable toad tadpoles will change their behavior to evade potential encounters with them.

Another predator present in areas inhabited by *Rhinella spinulosa* is the water bug (*Belostoma bifoveolatum*). Our surveys indicate that water bugs occasionally co-occur with *R. spinulosa* tadpoles. Thus, we were interested in evaluating whether chemical defenses (toxins) are also effective to sucking predators. Water bugs eat their prey by sucking body fluids and, therefore, are less affected by tadpole chemical defenses (Wassersug, 1973). In that case, we expect changes in behavior when tadpoles are in presence of sucking predators.

We examined the susceptibility of *R. spinulosa* tadpoles to predation by two species of predators, water bugs (*B. bifoveolatum*) and odonate larvae (*Rhionaeschna variegata*). In a previous study, we determined that toad tadpole chemical defenses are effective against odonate larvae (Jara and Perotti, 2006). There is evidence that some predators can learn to avoid unpalatable prey (Kruse and Stone, 1984), but we did not test the ability of odonate larvae to discern between palatable and unpalatable tadpoles. Furthermore, our surveys indicate that water bugs frequently co-occur with *R. spinulosa* tadpoles representing a genuine risk for them. In this paper, we (1) examined the effectiveness of toad chemical defenses to predators with piercing-sucking mouthparts such as water bugs, (2) compared the behavioral response of toad tadpoles to dragonfly larvae with chewing mouthparts and water bugs with piercing-sucking mouthparts, and (3) tested the ability of chewing predators (*R. variegata*) to discern between palatable and nonpalatable tadpoles.

#### MATERIALS AND METHODS

*Rhinella spinulosa* is a common toad inhabiting temporary ponds and lagoons in Andean areas of Patagonia, Argentina. Tadpole palatability of *R. spinulosa* differs with developmental stage. Tadpoles of stages 24–26 (category I; Gosner, 1960) and stages 32–34 (category II) are unpalatable to dragonfly larvae, whereas stages 38–40 (categories III) and stages 42–45 (category IV) are increasingly palatable (Jara and Perotti, 2006). These tadpoles form dense aggregations in the shallows composed of individuals at different stages of development and, thus, different levels of palatability (Jara, 2002; Jara et al., 2006).

We collected eggs from eight different clutches of *R. spinulosa* in a permanent pond close to Arroyo Ñireco, 5 km southwest of San Carlos de Bariloche city, Patagonia, Argentina (41°10'52"S; 71°19'13.6"W; 906 msnm) on December 2006, brought them to the laboratory, and reared them until they attained developmental stages corresponding to each one of the categories. There are several potential predator species sharing the pond with *R. spinulosa* tadpoles, including the backswimmer *Notonecta vereertbruggheni* Hungerford (Notonectidae), water bug *B. bifoveolatum* (Belostomatidae), water beetle larvae *Rhantus antarcticus nahuelis* (Dytiscidae), dragonfly larvae *R. variegata* (Aeshnidae), and the Southern Lapwing *Vanellus chilensis*. The dragonfly larvae *R. variegata* were the most abundant of the predators. During rainy years when aquatic vegetation increased in the lagoons, it is common to find adults and nymphs of *B. bifoveolatum*. Both *Rhionaeschna* and *Belostoma* are largely sit-and-wait predators; however, *R. variegata* searches more actively for prey than *B. bifoveolatum* (FGJ, pers. obs.). Sharing the habitat is another common and widespread Patagonian anuran, *Pleurodema bufoninum*, which breeds in temporary or small permanent ponds (Weigandt et al., 2004). During the spring, both anurans co-occur in some of the permanent ponds. Tadpoles of *P. bufoninum* are palatable to *R. variegata* throughout their ontogeny, and the species was used in our experiments as the alternative prey.

*Experiment 1: The Effectiveness of Toad Chemical Defenses on a Predator with Piercing-Sucking Mouthparts.*—To test whether chemical defenses are effective against predators with piercing-sucking mouthparts, we performed an experiment with *B. bifoveolatum*. We performed a factorial experiment with 4 × 2 treatments with tadpole developmental category and predator as main factors. Four developmental categories were employed following the criteria used in Jara and Perotti (2006): Gosner (1960) stages 24–26, 32–34, 38–40, and 42–45, for categories I to IV respectively, and two levels for the predator treatment (with and without predator). The factorial design resulted in eight treatment combinations replicated five times for a total of 40 experimental units. Treatments were set up in plastic bowls (10-cm diameter) filled with one liter of tap water. Half of the bowls (with predator treatment) contained one adult predator, *B. bifoveolatum* (TL = 2.1 ± 0.2 mm, N = 20) and five tadpoles of a given developmental category (total length ± SE, N = 25 tadpoles per category; category I: TL = 11.60 ± 0.09 mm, category II: TL = 17.7 ± 0.42 mm, category III: TL = 28.9 ± 0.18 mm, category IV: 30.9 ± 0.3 mm). The nonpredator set (control treat-

ment) of bowls ( $N = 20$ ) contained only five tadpoles. Individual tadpoles were never used in more than one test. The experiment was run for two hours in a room with controlled photoperiod (12:12 L:D) and artificial light provided by two fluorescent lamps (Philips daylight, TLT 40W/54RS) at an average room temperature of  $16^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . At the end of the experiment, the proportion of tadpoles consumed (number consumed/number offered) was recorded and transformed to the arcsine square-root for the statistical analysis. Because the data were normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test  $P > 0.05$ ), the data were analyzed with two-way ANOVA to test predation rate. All pairwise comparisons were analyzed by the Holm-Sidak method (Zar, 1999).

*Experiment 2: Behavior of Toad Tadpoles Exposed to Chewing and Sucking Predators.*—Here, we examined the behavioral responses (activity) of toad tadpoles exposed to chemical cues of *Rhionaeschna* and *Belostoma* predators. Three *R. spinulosa* clutches were collected at the Arroyo Nireco locality, brought to the laboratory, and reared until they attained developmentally palatable and unpalatable stages corresponding to categories I (stages 24–26, TL =  $11.79 \pm 1.09$  mm,  $N = 30$ ; Gosner, 1960) and III (stages 38–40, TL =  $30.5 \pm 2.5$  mm,  $N = 30$ ), respectively (see Jara and Perotti, 2006). Tadpoles were fed ad libitum with algae *Chlamydomonas* spp. (100 ml daily). The experiment consisted of a  $3 \times 2$  factorial design with predator (the control, chewing odonate larvae, and piercing-sucking water bug) and tadpole category (young and unpalatable versus older and palatable *R. spinulosa* tadpoles to dragonfly larvae) as factors. The control treatment consisted of empty predator cages. Each treatment was replicated 10 times. Trials for activity were run in 1.5-liter plastic tubs ( $24 \times 12 \times 5$  cm) filled with tap water and containing a plastic predator cage and one tadpole. We used cylindrical cages (5 cm diameter  $\times$  10 cm long) constructed of plastic mesh to house predators with the tadpoles. Cages allowed for exchange of water while preventing predators from taking tadpoles. The predator cage was positioned at one end of the tub and contained one predator in the predator treatments. Before the experiment started, tadpoles and predators were acclimated to the tubs for 30 min. Activity was recorded as scan observations with 20-sec intervals, and data were expressed as the proportion of total observations (five) per session per tub (Martin and Bateson, 1993). A tadpole was considered active if it was swimming or stationary but with its tail moving. Tadpoles were never used in more than one trial. Tadpole activity was analyzed by two-way ANOVA for the fixed

effects of predators (control, chewing, and sucking feeders), tadpole stage (young and unpalatable, older and palatable), and their interactions. All pairwise post hoc comparisons were analyzed by Tukey tests to maintain experimentwise error of  $\alpha = 0.05$  (Zar, 1999).

*Experiment 3: Prey Selection Based on Palatability.*—To determine whether dragonfly larvae preferentially select palatable prey, we performed selection experiments that consisted of offering the predator three different combinations of prey: (1) an unpalatable *R. spinulosa* tadpole (TL =  $11.65 \pm 0.14$  mm,  $N = 10$ ) + a palatable *P. bufoninum* tadpole (alternative prey) (TL =  $11.1 \pm 0.2$  mm, stages 26–27,  $N = 10$ ); (2) an unpalatable *R. spinulosa* tadpole (TL =  $11.8 \pm 0.15$  mm,  $N = 10$ ) + a palatable *R. spinulosa* tadpole (TL =  $29.5 \pm 0.24$  mm,  $N = 10$ ); and (3) a palatable *R. spinulosa* tadpole (TL =  $29.5 \pm 0.23$  mm,  $N = 10$ ) + a palatable *P. bufoninum* tadpole (TL =  $32 \pm 0.28$  mm, stages 29–30,  $N = 10$ ). Each treatment (prey-combination) was replicated 10 times, and each replicate consisted of one predator and two tadpoles. Data collection consisted of one hour of continuous observation or until the predator caught the first prey. We recorded the type of tadpole selected by the predator. Also, the postcapture behavior of predators was recorded. Test individuals were never used in more than one trial. The binomial test was used to test the null hypothesis that the number of tadpoles selected by predators did not differ from random (between the two possible prey tadpoles). Thus, the expected probability for each observation data set was 0.5 (Lehner, 2000).

## RESULTS

*Experiment 1: The Effectiveness of Toad Chemical Defenses on Sucking Predator.*—The presence of predator negatively affected the survival of *R. spinulosa* tadpoles ( $F_{1,32} = 99.26$ ,  $P = 0.001$ ). *Belostoma bifoveolatum* consumed tadpoles of *R. spinulosa* from the four categories offered. However, the number of tadpoles eaten was significantly different between categories ( $F_{3,32} = 5.07$ ,  $P = 0.005$ ). Tadpoles from developmental categories I and II were consumed more often than tadpoles from categories III and IV (Holm-Sidak method, I vs. III,  $P = 0.006$ ; I vs. IV,  $P = 0.006$ ; II vs. III,  $P < 0.001$ ; II vs. IV,  $P < 0.001$ ; Fig. 1). The interaction between both factors (predator and tadpole category) was also significant ( $F_{3,32} = 5.07$ ,  $P = 0.005$ ).

*Experiment 2: Behavior of Toad Tadpoles Exposed to Chewing and Sucking Predators.*—Activity of toad tadpoles was affected significantly by type of predator ( $F_{2,54} = 3.46$ ,  $P = 0.03$ ) but not by tadpole category ( $F_{1,54} = 2.56$ ,  $P = 0.11$ ). The

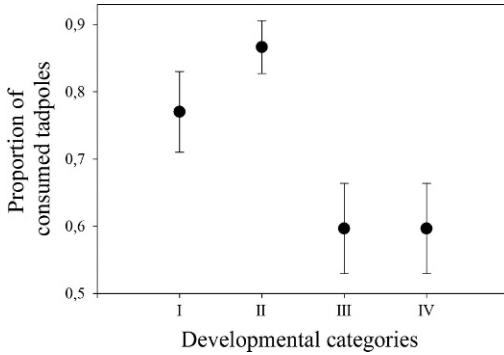


FIG. 1. Proportion of *Rhinella spinulosa* tadpoles from the four categories of development consumed by *Belostoma bifoveolatum*. (Stages according to Gosner, 1960; Category I: stages 24–26, Category II: stages 32–34, Category III: stages 38–40, Category IV: stages 42–45; Jara and Perotti, 2006.) Dots are mean with  $\pm$  SE.

interaction between predator and tadpole category was significant ( $F_{2,54} = 3.64$ ,  $P = 0.03$ ). The interaction could be explained by the strong reduction of the activity of palatable tadpoles compared with the unpalatable tadpoles when exposed to *Rhionaeschna* (average proportion of activity  $\pm$  SE; palatable,  $0.40 \pm 0.095$ ; unpalatable,  $0.58 \pm 0.12$ ). Activity was not different between control (palatable,  $0.80 \pm 0.076$ ; unpalatable,  $0.60 \pm 0.057$ ) and *Belostoma* treatments (palatable  $0.88 \pm 0.064$ ; unpalatable  $0.60 \pm 0.075$ ; Tukey test,  $Q = 0.491$ ,  $P = 0.94$ ; Fig. 2).

**Experiment 3: Prey Selection Based on Palatability.**—Palatable *P. bufoninum* tadpoles were selected significantly more often by dragonfly larvae when a combination of unpalatable tadpoles of *R. spinulosa* and palatable was offered, with 80% of the first captures on the palatable *P. bufoninum* ( $P = 0.04$ ). In the remaining prey combinations, predators did

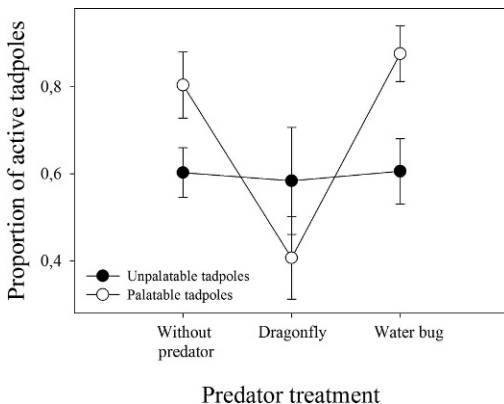


FIG. 2. Activity of unpalatable and palatable *Rhinella spinulosa* tadpoles in three different predator treatments. Dots are mean with  $\pm$  SE.

not select palatable prey significantly more often than unpalatable ones. The palatable and unpalatable *R. spinulosa* prey-combination experienced 70% of the first captures on palatable tadpoles ( $P = 0.07$ ), and when palatable *R. spinulosa* and palatable *P. bufoninum* tadpoles were offered, 60% of palatable *R. spinulosa* were consumed by the predator ( $P = 0.20$ ). A rejection behavior of unpalatable tadpoles was observed in all the predator attacks recorded (100% rejection of the unpalatable tadpoles that were captured).

## DISCUSSION

Our previous work has shown ontogenetic variation in the palatability of *R. spinulosa* tadpoles exposed to dragonfly larvae of *R. variegata* (Jara and Perotti, 2006). When dragonfly larvae capture the tadpole and chew them, this consequently releases the toxins in the tadpole skin. Our previous work suggests that the toxin concentrations in the skin diminish with growth such that the tadpole becomes palatable to dragonfly larvae. This could be indirectly inferred through the observed increase in mortality (higher consumption) when advanced stages are exposed to dragonfly predation (Jara and Perotti, 2006). These results agree with other studies that found eggs and hatchlings significantly more unpalatable than later larval stages (Gunzburger and Travis, 2005).

Our results confirm that *R. spinulosa* tadpole unpalatability is effective for predators that chew the tadpoles, as is the case of *R. variegata*. However, this constitutive defense is only effective for early stages of development. Also, we observed that at more advanced stages when the chemical defense is less effective, tadpoles change their behavior by reducing their activity to prevent predator encounters, thereby effectively reducing their risk of consumption (Miner et al., 2005).

These behavioral responses have been reported for tadpoles responding to several different prey (Sih, 1987; Lima and Dill, 1990). Chemical defense only are effective against *Rhionaeschna* at early ontogenetic stages. However, this response was not effective for *B. bifoveolatum*, which have piercing-sucking mouthparts. We observed *Belostoma* eating toad tadpoles and discarding the epithelial tissue intact (skin) after consumption. This kind of feeding behavior protects predators from toxins concentrated in the skin of prey (Peterson and Blaustein, 1991). Previous work showed that chemical defenses that are concentrated in the skin are less effective on species that suck body fluids from prey (Wassersug, 1973; Wilbur, 1997).

Gunzburger and Travis (2005) suggested that unpalatability is more evident in early stages, such as embryos and new hatching tadpoles. Our results support this hypothesis, and in fact, a previous study showed that lower mortality occurs in embryos and early larvae stages of *R. spinulosa* (Jara and Perotti, 2006).

Our data support the hypothesis that the immobile condition at early stage might confer a supplementary advantage to active-searcher predators (*R. variegata*) allowing tadpoles to reduce potential encounter rates with predators (Kats et al., 1988; Lawler, 1989; Richardson, 2001). By being still they may simply be less likely to attract visually oriented predators. Tadpoles of *R. spinulosa* reinforce the effectiveness of their chemical defenses by concealing themselves from active-searcher predators, but at palatable stages, it could negatively affect the foraging rate, resulting in a fitness cost (metamorphose at smaller size in the presence of predator cues; Skelly and Werner, 1990). However, this needs to be investigated in future studies. Also, we found other predators at our study site (*Rhantus* sp. and *Notonecta* sp.) that prefer to attack early stages of *R. spinulosa* presumably because larger prey were too big for them to capture. These predators rejected unpalatable prey after capture (unpubl. data). Thus, the attacks resulted in low mortality rates. In that case, the low activity rate at smaller stages could result in a good strategy for reducing their visibility to active predators (Skelly, 1994).

Models and experimental studies suggest that constitutive and inducible defenses are alternative modes of defense (Poirineau et al., 2004). Particularly, it has been studied in plants as a response to herbivory (Karban and Baldwin, 1997). We suggest that *R. spinulosa* tadpoles display both constitutive and induced defense components as well. Because several toad developmental stages are unpalatable to many invertebrate and vertebrate predator species, unpalatability (i.e., a constitutive defense) is an important defense mechanism against predators. A recent study on other anuran species (Alvarez and Nicieza, 2006) has already suggested the existence of a mixed defense strategy involving constitutive and induced components. *Chaunus* tadpoles change their behavior when exposed to odonate predators, a common predator at ponds inhabited by toad tadpoles. Studies testing predator selectivity with anurans as alternative prey are uncommon. In general, alternative prey consists of small invertebrates such as zooplankton (Semlitsch, 1993) and chironomid larvae (Miaud, 1993). Our selectivity experiments using palatable toad tadpoles and other palatable anuran species as

alternative prey revealed the ability of dragonfly larvae to recognize unpalatable from palatable tadpoles. *Rhionaeschna* selection for palatable tadpoles was significant, with 80% of the first successful attacks on palatable tadpoles of *Pleurodema bufoninum*, when unpalatable *Rhinella* tadpoles and *Pleurodema* palatable tadpoles were offered. But, we do not know whether this predator's ability to select for palatable prey is a result of experience or genetics. The fact that selectivity was not significantly different when palatable and unpalatable toad tadpoles were offered could reinforce the kin-selection hypothesis for the evolution of aggregations in the larvae of palatable amphibians suggested by Wassersug (1973) and Waldman and Adler (1979). *Rhionaeschna* predators could have acquired the ability to avoid unpalatable forms enhancing the survivorship of tadpoles that aggregate, if the aggregation releases a greater concentration of aposematic cues (chemical or visual), as was postulated in other studies (Brodie and Formanowicz, 1987).

Evidence obtained through our feeding, behavioral, and choice experiments suggest that unpalatability is an important constitutive defense mechanism for early developmental stages (eggs/early larvae). Inducible defenses, expressed in this anuran species as the reduction of activity rate, represent an alternative defense strategy at vulnerable palatable stages when exposed to odonate predators.

The coexistence and transition between constitutive and inducible defenses represent an example of defense induction in anurans previously documented in plant studies. Agrawal and Karban (1999) postulated that the value of induction is the reduced cost in defending against enemies only when they are present; prey benefit from little or no costs when there are not at risk of attack. However, this hypothesis needs to be further evaluated in *R. spinulosa* tadpoles. Our results show activity differences between tadpoles exposed and not exposed to odonate naiads. Although this supports the idea of induced defenses, we need to test whether those defenses represent a real cost—for example, a reduction in growth.

*Rhinella spinulosa* is commonly found in temporary ponds, which change predator-prey composition in relationship to external factors such as precipitation (FGJ, unpubl. data). Consequently, ponds have a great diversity of predator, prey, and alternative prey composition. We consider that the alternative modes of defense in tadpoles of the toad *R. spinulosa* and the transition between them are an important survival mechanism in response to variable predator risk in those habitats.

*Acknowledgments.*—This research was performed under the institutional Animal Care guidelines established by Argentinean animal protection law and Administración de Parques Nacionales, Argentina. Animals for this study were collected with the permission of Administración de Parques Nacionales, Argentina. We thank R. Wassersug and J. Phillips for language edition and helpful comments. We also would like to thank D. Saenz and an anonymous reviewer who provided comments that improved the manuscript. J. Muzon and S. Mazzucconi for insect species determination. This work was supported by Universidad Nacional del Comahue (B940), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (PIP 6451) and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-13550).

## LITERATURE CITED

- AGRAWAL, A. A., AND R. KARBAN. 1999. Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. *In* R. Tollrian and D. C. Harvell (eds.), *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*, pp. 45–61. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- ÁLVAREZ, D., AND A. G. NICIEZA. 2006. Factors determining tadpole vulnerability to predators: can prior experience compensate for a suboptimal shape? *Evolutionary Ecology* 20:523–534.
- ANHOLT, B. R., D. K. SKELLY, AND E. E. WERNER. 1996. Factors modifying antipredator behaviour in larval toads. *Herpetologica* 52:301–313.
- BRODIE, E. D., JR., AND D. R. FORMANOWICZ JR. 1987. Antipredator mechanisms of larval anurans: protection of palatable individuals. *Herpetologica* 43:369–373.
- BRODIE, E. D., JR., D. R. FORMANOWICZ, JR., AND E. D. BRODIE III. 1978. The development of noxiousness of *Bufo americanus* tadpoles to aquatic insect predators. *Herpetologica* 34:302–306.
- CROSSLAND, M. R. 2001. Ability of predatory native Australian fishes to learn to avoid toxic larvae of the introduced toad *Bufo marinus*. *Journal of Fish Biology* 59:319–329.
- DUELLMAN, W. E., AND L. TRUEB. 1999. *Biology of Amphibians*. John Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- EKLÖV, P., AND E. E. WERNER. 2000. Multiple predator effects on size-dependent behavior and mortality of two species of anuran larvae. *Oikos* 88:250–258.
- GOSNER, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos on larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190.
- GUNZBURGER, M. S., AND J. TRAVIS. 2005. Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *Journal of Herpetology* 39:547–571.
- JARA, F. G. 2002. Aspectos Ecológicos y Comportamentales en Larvas de dos Anuros Patagónicos: *Pleurodema bufoninum* (Leptodactylidae) y *Bufo spinulosus papillosus* (Bufonidae). Unpubl. thesis, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina.
- JARA, F. G., AND M. G. PEROTTI. 2006. Variación ontogenética en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus* Philippi, 1902 (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología* 19:37–42.
- JARA, F. G., M. LOZADA, AND C. A. ÚBEDA. 2006. *Bufo spinulosus papillosus* tadpole behavior. *Herpetological Review* 37:201.
- KARBAN, R., AND I. T. BALDWIN. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.
- KATS, L. B., AND L. M. DILL. 1998. The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5:361–394.
- KATS, L. B., J. W. PETRANKA, AND A. SIH. 1988. Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes. *Ecology* 69:1865–1870.
- KRUSE, K. C., AND B. M. STONE. 1984. Largemouth bass, *Micropterus salmoides*, learn to avoid feeding on toad (*Bufo*) tadpoles. *Animal Behaviour* 32:1035–1039.
- LARSSON, P., AND S. DODSON. 1993. Chemical communication in planktonic animals. *Archiv für Hydrobiologie* 129:129–155.
- LAURILA, A. 2000. Behavioural responses to predator chemical cues and local variation in antipredator performance in *Rana temporaria* tadpoles. *Oikos* 88:159–168.
- LAWLER, S. P. 1989. Behavioral responses to predation and predation risk in four species of larval anurans. *Animal Behaviour* 38:1039–1047.
- LEHNER, P. N. 2000. *Handbook of Ethological Methods*. Cambridge University Press, Cambridge.
- LIMA, S. L., AND L. M. DILL. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68:619–640.
- MARTIN, P., AND P. BATESON. 1993. *Measuring Behaviour. An Introductory Guide*. Cambridge University Press, Cambridge.
- MIAUD, C. 1993. Predation on newt eggs (*Triturus alpestris* and *T. helveticus*): identification of predators and protective role of oviposition behaviour. *Journal of Zoology* 231:575–582.
- MINER, B. G., S. E. SULTAN, S. G. MORGAN, D. K. PADILLA, AND R. A. RELYEA. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology, and Evolution* 20:685–692.
- PEARL, C. A., M. J. ADAMS, G. S. SCHUYTEMA, AND A. V. NEBEKER. 2003. Behavioral responses of anuran larvae to chemical cues of native and introduced predators in the Pacific Northwestern United States. *Journal of Herpetology* 37:572–576.
- PETERSON, J. A., AND A. R. BLAUSTEIN. 1991. Unpalatability in anuran larvae as a defense against natural salamander predators. *Ethology Ecology and Evolution* 3:63–72.
- . 1992. Relative palatabilities of anuran larvae to natural aquatic insect predators. *Copeia* 1992:577–584.
- POITRINEAU, K., S. P. BROWN, AND M. E. HOCHBERG. 2004. The joint evolution of defense and inducibility against natural enemies. *Journal of Theoretical Biology* 231:389–396.

- RICHARDSON, J. M. L. 2001. A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators. *Behavioral Ecology* 12:51–58.
- RUNDIO, D. E., AND D. H. OLSON. 2003. Antipredator defenses of larval Pacific Giant Salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) against Cutthroat Trout (*Oncorhynchus clarki*). *Copeia* 2003:392–397.
- SCHMIDT, B. R., AND A. AMEZQUITA. 2001. Predator-induced behavioral responses: tadpoles of Neotropical frog *Phyllomedusa tarsius* do not respond to all predators. *Herpetological Journal* 11:9–15.
- SCHOEPFNER, N. M., AND R. A. RELYEA. 2005. Damage, digestion, and defense: the roles of alarm cues and kairomones for inducing prey defenses. *Ecology Letters* 8:505–512.
- SEMLITSCH, R. D. 1993. Effects of different predators on the survival and development of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Oikos* 67:40–46.
- SEMLITSCH, R. D., AND S. GAVASSO. 1992. Behavioral responses of *Bufo bufo* and *Bufo calamita* to chemical cues of vertebrate and invertebrate predators. *Ethology, Ecology and Evolution* 4:165–173.
- SIH, A. 1980. Optimal behavior: can foragers balance two conflicting demands? *Science* 210:1041–1043.
- . 1987. Predator and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview. In W. C. Kerfoot and A. Sih (eds.), *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*, pp. 203–224. University Press of New England, Hanover, NH.
- SKELLY, D. K. 1994. Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation. *Animal Behaviour* 47:465–468.
- SKELLY, D. K., AND E. E. WERNER. 1990. Behavioral and life-historical responses of larval American toads to an odonate predator. *Ecology* 71:2313–2322.
- TOLLRIAN, R., AND C. D. HARVELL. 1999. *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- WALDMAN, B., AND K. ADLER. 1979. Toad tadpoles associate preferentially with siblings. *Nature* 282:611–613.
- WASSERSUG, R. J. 1973. Aspects of social behavior in anuran larvae. In J. L. Vial (ed.), *Evolutionary Biology of Anurans: Contemporary Research on Major Problems*, pp. 273–297. University Missouri Press, Columbia.
- WEIGANDT, M., C. A. ÚBEDA, AND M. DIAZ. 2004. The larva of *Pleurodema bufoninum*, Bell, 1843 with comments on its biology and on eggs strings (Anura, Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia* 25:429–437.
- WILBUR, H. M. 1997. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology* 78:2279–2302.
- ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- ZUG, G. R., L. J. VITT, AND J. P. CALDWELL. 2001. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

Accepted: 24 June 2008.

---

VARIACIÓN ONTOGENÉTICA EN LA PALATABILIDAD  
DE LOS RENACUAJOS DE BUFO SPINULOSUS PAPILLOSUS  
PHILIPPI, 1902 (ANURA, BUFONIDAE)

---

FABIÁN GASTÓN JARA & MARÍA GABRIELA PEROTTI

Laboratorio de Fotobiología, CRUB-UNCOMA (CONICET), Quintral 1250, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

fjara@crub.uncoma.edu.ar

gperotti@crub.uncoma.edu.ar

**R E S U M E N.** — Se evaluó la variación ontogenética de la palatabilidad en *Bufo spinulosus papillosus* expuestos a larvas del odonato *Rhionaeshna variegata* (Odonata, Aeshnidae). Los renacuajos fueron agrupados en cuatro categorías de desarrollo y fueron expuestos a la depredación directa determinándose el número de renacuajos consumidos al finalizar los experimentos. *Bufo spinulosus papillosus* no fue palatable en los primeros estadios del desarrollo (categorías I, estadios 24-26 y categoría II, estadios 32-34), mientras que los estadios de las categoría III (estadios 38-40) y categoría IV (estadios 42-45) fueron progresivamente palatables. Se observó un comportamiento de rechazo por parte de los depredadores luego de la captura de renacuajos de las categorías I y II. El patrón de palatabilidad encontrado en *Bufo spinulosus papillosus* difiere del observado en otras especies relacionadas del género *Bufo* (Brodie y Formanowicz, 1987; Kehr y Schnack, 1991; Lawler y Hero, 1997).

Palabras clave: *Bufo spinulosus papillosus*, palatabilidad, ontogenia, depredación.

**A B S T R A C T.** — We evaluated the ontogenetic variation in the palatability of *Bufo spinulosus papillosus* tadpoles exposed to odonate larvae of *Rhionaeshna variegata* (Odonata, Aeshnidae). We exposed tadpoles to direct predation and determined the number of consumed tadpoles in four developmental categories. *Bufo spinulosus papillosus* tadpoles of categories I (stages 24-26) and II (stages 32-34) were unpalatable, while categories III (stages 38-40) and IV (stages 42-45) were progressively palatable. We observed a post-capture rejection behavior when they caught unpalatable tadpoles in categories I and II. The palatability pattern observed in *Bufo spinulosus papillosus* was different from related *Bufo* species (Brodie and Formanowicz, 1987; Kehr and Schnack, 1991; Lawler and Hero, 1997).

Keywords: *Bufo spinulosus papillosus*, palatability, ontogeny, predation.

#### INTRODUCCIÓN

La depredación es uno de los factores más importantes en la determinación de la distribución de la especie de anuros, así como también de la estructura y composición de sus comunidades (Morin, 1983; Van Buskirk, 1988; Sredl y Collins, 1992). Los anuros son depredados por un gran número de taxa tanto en su fase embrionaria, larvaria como adulta. A lo largo de su ciclo de vida parecen ser más vulnerables en su

fase larvaria, sobre todo durante el clímax metamórfico, momento en el que pierden la capacidad natatoria (Wassersug y Sperry, 1977; Formanowicz y Brodie, 1982). La depredación en esta fase del ciclo de vida de los anuros puede estar reducida por el desarrollo de coloraciones crípticas, por presentar toxinas en la piel, o por cambiar sus comportamientos (Brodie *et al.*, 1978; Beiswenger, 1981; Branch, 1983; Brodie y For-

manowicz, 1987; Skelly y Werner, 1990; Rundio y Olson, 2001; Van Buskirk, 2001).

En el género *Bufo*, Laurenti, 1768, se han estudiado las defensas antidepredatorias en renacuajos observándose entre las más frecuentes cambios en el comportamiento y presencia de toxinas en la piel que los hace no palatables para ciertos depredadores (Formanowicz y Brodie, 1982; Skelly y Werner, 1990; Anholt *et al.*, 1996; Kiesecker *et al.*, 1996). La no palatabilidad es particularmente eficiente en este género para insectos acuáticos (larvas de odonatos y coleópteros) y algunos vertebrados (Formanowicz y Brodie, 1982; Kehr y Schnack, 1991; Lawler y Hero, 1997). Brodie *et al.* (1978) y Brodie y Formanowicz (1987) observaron que las larvas de *Bufo americanus*, Holbrook, 1836, no son palatables para larvas de odonatos en estadios tempranos (post-eclosión, 22-30) y del clímax metamórfico (46). Sin embargo, estadios intermedios (30-33) fueron palatables para estos depredadores. Lawler y Hero (1997) por su parte demostraron que las larvas de *Bufo marinus* (Linnaeus, 1758) no son palatables en el rango de estadios 25-41 para un depredador pez. Estos resultados demuestran que la ontogenia de la palatabilidad en este género presenta variabilidad y que varía con el tipo de depredador.

*Bufo spinulosus papilloso* es un sapo que habita tanto el bosque como la estepa patagónica, se reproduce en una amplia variedad de tipos de hábitat desde charcas temporarias hasta remansos de ríos y arroyos. En la naturaleza su desarrollo embrionario se extiende a lo largo de dos a tres meses (Jara, obs. pers.) compartiendo el hábitat con depredadores como larvas de aeshnidos (Odonata: Aeshnidae). El objetivo de este trabajo es estudiar la variación ontogenética en la palatabilidad de *Bufo spinulosus papilloso* frente a un depredador natural que coexiste con estos renacuajos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con una población de *Bufo spinulosus papilloso* ubicada en el noroeste Patagónico, próxima a la ciudad de San Carlos de Bariloche, donde la especie se reproduce en una laguna permanente de 20 m<sup>2</sup> de superficie (41°10'52"S – 71°19'13,6"O, 906 msnm). Durante la primera semana de Octubre de 2003 se colectaron en el sitio de estudio oviposturas de *B. spinulosus papilloso* y larvas del depredador *Rhionaeschna variegata* (Fabricius, 1775) (Odonata: Aeshnidae), las que fueron empleadas para estudiar la palatabilidad de los renacuajos. Esta especie de odonato es la más común y abundante en los ambientes en los que habitan las larvas de *B. spinulosus papilloso* (Perotti *et al.* 2004). Las oviposturas (n= 4) se colocaron en piletones de 164 x 70 x 43 cm llenos hasta la mitad de su volumen con agua natural proveniente del arroyo Gutiérrez y se mantuvieron hasta la eclosión a temperatura ambiente y fotoperíodo natural. Luego de la eclosión las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con algas y plantas acuáticas colectadas en el sitio de estudio.

Para evaluar si la palatabilidad de *B. spinulosus papilloso* varía ontogenéticamente se realizó un experimento de tipo factorial con dos factores: a) depredador, con dos niveles (presencia-ausencia) y b) ontogenia, con cuatro niveles (4 categorías de desarrollo: categoría I, estadios 24-26 (Gosner, 1960) ( $\bar{x}$ = 11,79 mm  $\pm$  SD= 1,09; n= 50), categoría II, estadios 32-34 ( $\bar{x}$ = 17,81 mm  $\pm$  SD=0,92; n= 50), categoría III, estadios 38-40 ( $\bar{x}$ = 30,5 mm  $\pm$  SD= 2,5; n= 50) y categoría IV, estadios 42-45 ( $\bar{x}$ = 31,86 mm  $\pm$  SD= 2,39; n= 50). El experimento duró 2 horas luego de las cuales se determinó la supervivencia (número de renacuajos vivos/réplica) y el número total de renacuajos palatables/réplica. Se consideró que un renacuajo era palatable cuando era completamente consumido por el depredador. Además, para complementar



estos resultados se realizaron observaciones de comportamiento cualitativas del depredador, para determinar capturas con posterior rechazo y capturas efectivas (consumo completo de la presa). Los tratamientos (total= 8) fueron replicados 10 veces y cada réplica presentó 6 renacuajos y un depredador en los tratamientos con depredador. Todas las presas y depredadores se emplearon una única vez.

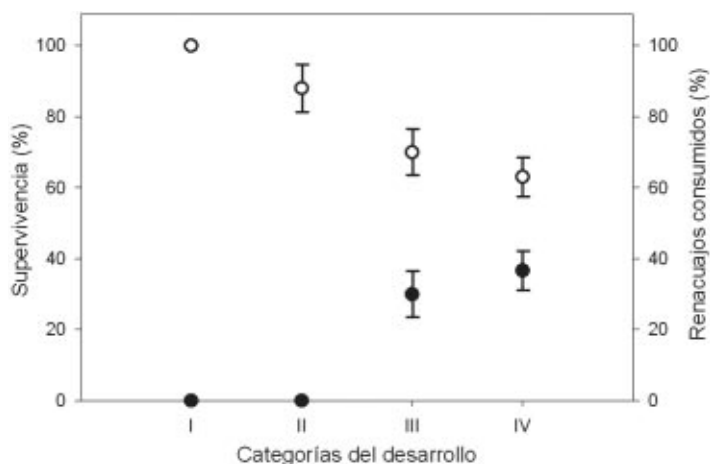
Los depredadores fueron ubicados en recipientes individuales con 250 ml de agua y no fueron alimentados durante los dos días previos a los experimentos. Se emplearon larvas de *Rhionaeschna variegata* (talla  $\bar{X}$ = 28,99 mm  $\pm$  SD= 1,94; n= 40) para todas las categorías de desarrollo de renacuajos. Todos los experimentos se llevaron a cabo con luz artificial entre las 10:00 y las 16:00 h a una temperatura de 16 °C  $\pm$  1. Para los experimentos se emplearon recipientes de 0,75 l de capacidad en los que se colocó un tubo cilíndrico plástico y hueco como sitio de percha para los depredadores. Se probó la normalidad y la homogeneidad de varianza de los datos. Debido a la ausencia de homogeneidad de varianza los datos de supervivencia fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis. Se empleó el test U de

Mann-Whitney para detectar que tratamientos difirieron entre sí.

## RESULTADOS

La tasa de supervivencia de renacuajos *Bufo spinulosus papillosus* decreció a lo largo de la ontogenia cuando fueron expuestos a *Rhionaeschna variegata* (Kruskal-Wallis U test<sub>3</sub>= 17,94, P= 0,0005). El número de renacuajos consumidos fue mayor en estadios más avanzados (Kruskal-Wallis U test<sub>3</sub>= 26,90, P< 0,00001) (Figura 1). Las comparaciones entre el número de renacuajos consumidos pueden verse en la Tabla 1. En las categorías I y II ningún renacuajo fue consumido por las larvas de *R. variegata* (Figura 1). Los estadios más avanzados (categorías III y IV; estadios 38-45 según Gosner, 1960) fueron los más susceptibles a la depredación. La supervivencia fue del 100% en todos los controles indicando que en el tiempo transcurrido del experimento la mortalidad natural fue nula.

Se observaron dos estrategias de captura en *Rhionaeschna variegata*. Una de ellas consistió en la espera al acecho ("sit and wait"), donde el depredador espera la aproximación de una



**Figura 1.** Porcentaje de supervivencia (símbolos blancos) y de renacuajos consumidos (símbolos negros) de *B. spinulosus papillosus* en cuatro categorías del desarrollo expuestas a larvas *R. variegata*. (X  $\pm$  SE).

presa, luego extiende la "máscara" (labio modificado) y conduce la presa hacia la boca. En la otra estrategia observada, el depredador detecta a la presa, realiza un acercamiento lento y cuando se encuentra a una distancia óptima para capturarla extiende la máscara. En el caso de renacuajos de estadios no palatables, se observó un rechazo pos-captura seguido de movimientos de limpieza de las piezas bucales, además no se observaron más de dos intentos de captura en cada réplica.

#### DISCUSIÓN

En general se ha observado que los huevos, embriones o renacuajos de *Bufo* son menos palatables que los de otros anfibios (Henrickson, 1990; Reading, 1990; Denton y Beebee, 1991; Peterson y Blaustein, 1991). Además, los estudios sobre palatabilidad en diferentes especies del género *Bufo* indican una gran variabilidad. Por ejemplo, Brodie y Formanowicz (1987) encontraron que los estadios post-eclosión de *Bufo americanus* no son palatables para depredadores vertebrados e invertebrados. Por otro lado, Lawler y Hero (1997) obser-

varon que la palatabilidad de *Bufo marinus* decrece a lo largo de la ontogenia frente a un depredador pez. También, se ha observado que *Bufo arenarum* puede resultar palatable a lo largo de toda la ontogenia para algunos depredadores insectos como los belostomátidos (Kehr y Schnack, 1991). De acuerdo a nuestros resultados los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus* no son palatables para el depredador *Rhionaeschna variegata* en estadios tempranos del desarrollo observándose además, un incremento progresivo de la palatabilidad a lo largo de la ontogenia. Se ha observado que la experiencia previa de los depredadores con estadios no palatables reduce la mortalidad en estadios palatables (Brodie y Formanowicz, 1987). Las larvas de *B. spinulosus papillosus* en sus hábitat naturales forman densas agregaciones mixtas (Jara, 2002). De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, dichas agregaciones mixtas estarían compuestas por estadios palatables y no palatables, sugiriendo que este comportamiento podría reducir la tasa de depredación en los estadios más susceptibles.

La hipótesis de no palatabilidad en estadios tempranos del desarrollo como

Categorías de desarrollo (estadios de desarrollo)	U Mann - Whitney	P
I vs II (24-26 vs 32-34)	50	1
I vs III (24-26 vs 38-40)	10	0,0025
I vs IV (24-26 vs 42-45)	5	0,0006
II vs III (32-34 vs 38-40)	10	0,0025
III vs IV (38-40 vs 42-45)	41	0,49

**Tabla 1.** Comparación del porcentaje de renacuajos consumidos en las 4 categorías de desarrollo de *Bufo spinulosus papillosus* expuestos a larvas de *R. variegata*. Los valores en negrita indican diferencias significativas,  $\alpha = 0,05$ .

resultado de la presencia de toxinas presente en la yema de los huevos (Brodie y Formanowicz, 1987) podría explicar el 100% de supervivencia observado en la categoría I (estadios 24-26) en *Bufo spinulosus papillosus*. Algunos estudios, proponen que la no-palatabilidad en estadios avanzados del desarrollo (clímax metamórfico) está asociada al desarrollo e incremento de la actividad de glándulas granulares responsables de la producción de toxinas (Garton y Mushinsky, 1979; Formanowicz y Brodie, 1982; Brodie y Formanowicz, 1987). Es posible que en estadios avanzados de *B. spinulosus papillosus* estas glándulas aún no estén bien desarrolladas (categoría 4, estadios 42-45) resultando palatables para estos depredadores. Sin embargo este aspecto no fue analizado en este estudio, resultando una hipótesis a ser testeada en el futuro.

En los ambientes patagónicos que habita *B. spinulosus papillosus* existen otros depredadores como insectos, arañas semiacuáticas (Jara y Perotti, 2004) y vertebrados, por lo que se pretende continuar investigando la efectividad de este mecanismo de protección frente a otros depredadores.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado en parte por el proyecto B-940 de la Universidad Nacional del Comahue. Agradecemos al Prof. Dr. J. Muzón por la determinación de las ninfas de odonatos. El Dr. F. Cruz realizó una lectura crítica de la primera versión del manuscrito. Las Dras. M. C. Diéguez y D. Milano colaboraron con la preparación de los experimentos.

#### LITERATURA CITADA

- ANHOLT, B. R.; D. K. SKELLY & E. E. WERNER. 1996. Factors modifying antipredator behaviour in larval

toads. *Herpetologica* 52 (3): 301-313.

- BEISWENGER, R. E. 1981. Predation by grey jays on aggregating tadpoles of the boreal toad (*Bufo boreas*). *Copeia* 1981 (2): 459-460.
- BRANCH, L. C. 1983. Social behavior of the tadpoles of *Phyllomedusa vaillanti*. *Copeia* 1983 (2): 420-428.
- BRODIE JR, E. D.; D. R. JR. FORMANOWICZ & E. D. BRODIE III. 1978. The development of noxiousness of *Bufo americanus* tadpoles to aquatic insect predators. *Herpetologica* 34: 302-306.
- BRODIE JR, E. D. & D. R. JR. FORMANOWICZ. 1987. Antipredator mechanisms of larval anurans: protection of palatable individuals. *Herpetologica* 43 (3): 369-373.
- DENTON, J. & T. J. C. BEEBEE. 1991. Palatability of anuran eggs and embryos. *Amphibia - Reptilia* 12: 111-114.
- FORMANOWICZ, D. R. JR & E. D. BRODIE JR. 1982. Relative palatabilities of members of a larval amphibian community. *Copeia* 1982: 91-97.
- GARTON, J. D. & H. R. MUSHINSKY. 1979. Integumentary toxicity and unpalatability as a defensive mechanism in *Gastrophryne carolinensis*. *Canadian Journal of Zoology* 57: 1965-1973.
- GOSNER, K. L. 1960. A simplified table for stage in anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- HENRICKSON, B. - I. 1990. Predation on amphibian eggs and tadpoles by common predators in acidified lakes. *Holarctic Ecology* 13: 201-206.
- JARA, F. G. 2002. Aspectos ecológicos y comportamentales en larvas de dos anuros Patagónicos: *Pleurodema bufoninum* (Leptodactylidae) y *Bufo spinulosus papillosus* (Bufonidae)". Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche. 106 pp.

- JARA, F. & M. G. PEROTTI. 2004. *Pleurodema bufoninum* and *Bufo spinulosus papillosus*. Predation", *Herpetological Review* 35 (2): 162.
- KEHR, A. I. & J. A. SCHNACK. 1991. Predator – prey relationship between giant water bugs (*Belostoma oxyurum*) and larval anurans (*Bufo arenarum*). *Alytes* 9 (3): 61-69.
- KIESECKER, J. M.; D. P. CHIVERS & A. R. BLAUSTEIN. 1996. The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles. *Animal Behaviour* 52: 1.237-1.245.
- LAWLER, K. L. & J. – M. HERO. 1997. Palatability of *Bufo marinus* tadpoles to a predatory fish decreases with development. *Wildlife Research* 24: 327-334.
- MORIN, P. J. 1983. Predation, competition, and the composition of larval anuran guilds. *Ecological Monographs* 53 (2): 119-138.
- PETERSON, J. A. & A. R. BLAUSTEIN. 1991. Unpalatability in anuran larvae as a defence against natural salamander predators. *Ethology Ecology and Evolution* 3: 63-72.
- PEROTTI, M. G.; M. C. DIEGUEZ; F. JARA & P. PEREZ. 2004. Consideraciones sobre el efecto de las variables del clima y las interacciones biológicas sobre las comunidades acuáticas de humedales patagónicos. Actas del taller: Los Mallines en la Patagonia Argentina, Esquel, Chubut, 4 y 5 Marzo, 2004. 17 pp. INTA, Ciefap, ITAMA, PAN
- READING, C. J. 1990. Palmate newt predation on common frog, *Rana temporaria*, and common toad, *Bufo bufo* tadpoles. *Herpetological Journal* 1: 462-465.
- RUNDIO, D. E. & D. H. OLSON. 2001. Palatability of southern torrent salamander (*Rhyacotriton variegatus*) larvae to pacific giant salamander (*Dicamptodon tenebrosus*) larvae. *Journal of Herpetology* 35 (1): 133-136.
- SKELLY, D. K. & E. E. WERNER. 1990. Behavioral and life – historical responses of larval american toads to an odonate predator. *Ecology* 71 (6): 2.313-2.322.
- SREDL, M. J. & J. P. COLLINS. 1992. The interaction of predation, competition, and habitat complexity in structuring an amphibian community. *Copeia* 3: 607-614.
- VAN BUSKIRK, J. 1988. Interactive effects of dragonfly predation in experimental pond communities. *Ecology* 69 (3): 857-867.
- VAN BUSKIRK, J. 2001. Specific induced responses to different predator species in anuran larvae. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 482-489.
- WASSERSUG, R. J. & D. G. SPERRY 1977. The relationship of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hyliidae). *Ecology* 58: 830-839.