

GRENAT, PABLO R
Determinacion y anal

2012 71193

71193

MFN:
Clasif:
T-755

71193



Tesis Doctoral

Doctorado en Ciencias Biológicas



**Determinación y análisis de diferencias interespecíficas
en poblaciones simpátricas diplo/tetraploides del
género *Odontophrynus*: identificación geográfica de
zonas híbridas**

Licenciado Pablo R. Grenat

Director de Tesis: Dr. Adolfo L. Martino
Co-Director de Tesis: Dr. Ismael E. di Tada

Miembros de la Comisión Asesora y Jurado de Tesis:

Dra. Margarita Chiaraviglio

Dr. Rafael Lajmanovich

Dr. Hugo Varela

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto

Marzo 2012

A Florencia...

A mi madre...

A la memoria de mi padre...

AGRADECIMIENTOS

- ▣ A mi director, Adolfo Martino, por su apoyo constante y su confianza en mí durante todo este camino. Por poner siempre a mi disposición cada cosa que estaba a su alcance, preocupándose no solo por el “profesional” sino también por la “persona”. A mi Co- Director, Ismael di Tada por brindarme su experiencia.
- ▣ A los miembros de mi Comisión Asesora y Jurado de Tesis, Margarita Chiaraviglio, Rafael Lajmanovich y Hugo Varela, por el compromiso y tiempo dedicado. Por cada uno de sus aportes que han enriquecido enormemente mi formación y mi trabajo.
- ▣ A Nancy Salas, por su siempre buena predisposición para escucharme y aconsejarme en todo momento. Por su colaboración y preocupación constante.
- ▣ A todos mis compañeros de la cátedra de Ecología por cada minuto compartido. Por las charlas entre mate y mate, no solo las de sapos sino también las de la vida: Julián, Mariana, Clarisa, Ana Laura. A todos los que han ido incorporándose a través de estos años: Manuel, Fabio, Zulma, Celeste, Bruno.
- ▣ A mi madre, partícipe necesaria y fundamental de este momento. Por alentarme y acompañarme en cada etapa de mi vida. A toda mi familia por su permanente apoyo y preocupación.
- ▣ A Florencia, a quien amo profundamente, por caminar a mi lado, éste y tantos caminos. Por ser mi cómplice y sostén. Simplemente, por ser mi todo.
- ▣ A todos y cada uno de mis amigos, por ser parte importante de mi vida. A Emiliano por su compañía y ayuda en varios de mis viajes de campo.
- ▣ A la Universidad Nacional de Río Cuarto por brindarme el espacio y la posibilidad de formarme no solo como profesional, sino también como persona.
- ▣ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las Becas Doctorales otorgadas.
- ▣ A todas las personas que hicieron y hacen de mí lo que soy, porque en menor o mayor medida contribuyeron con este logro. A todos ellos gracias de corazón.
- ▣ A Dios.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los anfibios anuros	1
1.2. Zonas de contacto diplo/poliploides	4
1.3. El desplazamiento de caracteres	7
1.4. Caracteres morfológicos y etológicos	8
1.5. El caso en estudio	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Descripción de las especies en estudio	16
3.1.1. El género <i>Odontophrynus Reinhardt & Lutken, 1862</i>	16
3.1.1.1. <i>Taxonomía</i>	16
3.1.1.2. <i>Principales características morfológicas del género</i>	17
3.1.1.3. <i>Distribución geográfica</i>	18
3.1.2. Características generales de las especies <i>Odontophrynus americanus</i> y <i>O. cordobae</i>	20
3.1.2.1. <i>Odontophrynus americanus (Dumèril & Bibron, 1842)</i>	21
3.1.2.2. <i>Odontophrynus cordobae (Martino & Sinsch, 2002)</i>	22
3.2. Área de Estudio	25
3.2.1. Caracterización del área de estudio	28
3.2.1.1. <i>Caracterización Ecorregional</i>	28
3.2.1.2. <i>Clima</i>	34

3.2.1.3. <i>Geomorfología</i>	35
3.3. Métodos de Trabajo	36
3.3.1. <i>Determinación del nivel de ploidía</i>	36
3.3.1.1. <i>Eritrometría</i>	36
3.3.1.1.1. <i>Análisis del tamaño de eritrocitos en individuos juveniles y adultos</i>	36
3.3.1.1.2. <i>Determinación del valor límite para la separación de las especies</i>	38
3.3.1.1. <i>Citogenética</i>	38
3.3.2. <i>Morfometría</i>	41
3.3.3. <i>Bioacústica</i>	43
3.3.3.1. <i>Cantos de advertencia (advertisement call)</i>	43
3.3.3.2. <i>Cantos de liberación (release call)</i>	48
4. RESULTADOS	50
4.1. Eritrometría	50
4.1.1. <i>Variación en el tamaño de eritrocitos entre individuos juveniles y adultos</i>	50
4.1.2. <i>Determinación del valor límite para la separación de las especies</i>	52
4.1.3. <i>Análisis del tamaño de eritrocitos</i>	54
4.2. Citogenética	60
4.3. Morfometría	64
4.4. Bioacústica	74
4.4.1. <i>Análisis de los cantos de advertencia (advertisement call)</i>	74
4.4.1.1. <i>Identificación de individuos sintópicos</i>	74
4.4.1.2. <i>Análisis de las diferencias acústicas intra e interespecíficas</i>	74
4.4.1.3. <i>Análisis del patrón de variación acústica</i>	83
4.4.1.4. <i>Análisis de las diferencias entre poblaciones sintópicas y alopátricas</i>	84
4.4.2. <i>Análisis de los cantos de liberación (release call)</i>	92

5. DISCUSIÓN	95
5.1. Eritrometría	95
<i>5.1.1. Análisis tamaño de eritrocitos en individuos juveniles y adultos</i>	95
<i>5.1.2. Análisis del tamaño de los eritrocitos</i>	98
5.2. Citogenética	101
5.3. Morfometría	107
5.4. Bioacústica	112
<i>5.4.1. Canto de advertencia (advertisement call)</i>	112
<i>5.4.2. Canto de liberación (release call)</i>	118
5.5. Sobre las posibles causas de la variación acústica en poblaciones de <i>Odontophrynus cordobae</i> y <i>O. americanus</i>	120
6. CONSIDERACIONES FINALES	130
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	137
8. BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO I	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Variación en el patrón de manchas en las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> . En la parte superior se encuentran ejemplares diploides y en la parte inferior individuos tetraploides pertenecientes a la localidad sintópica de la Escondida.	20
Figura 2	<i>Odontophrynus americanus</i> Macho. Foto A. L. Martino.	20
Figura 3	Distribución conocida de la especie <i>Odontophrynus americanus</i> . Fuente: Amphibia Web.	21
Figura 4	<i>Odontophrynus cordobae</i> Macho. Foto A. L. Martino.	22
Figura 5	Distribución conocida de la especie <i>Odontophrynus cordobae</i> . Fuente: Amphibia Web.	23
Figura 6	Demarcación del área de estudio total del presente trabajo (izquierda) y del área potencial de simpatria y sintopia entre las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> (derecha).	25
Figura 7	Área potencial de simpatria y sintopia entre las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	26
Figura 8	Sitio de canto común de las especies en estudio. Ejemplar de <i>O. cordobae</i> perteneciente a la localidad de Berrotarán.	28
Figura 9	Ecorregiones de Argentina de acuerdo a Burkart et al. (1999).	30
Figura 10	Ambientes característicos donde fueron relevadas las poblaciones de <i>Odontophrynus</i> .	33
Figura 11	Medidas registradas sobre los eritrocitos y sus respectivos núcleos.	38
Figura 12	Medidas morfométricas relevadas en los individuos adultos de <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	42
Figura 13	Esquema de las variables medidas en el análisis bioacústico. DC: Duración del canto; DIC: Duración del intervalo entre cantos; DP: Duración del pulso; DIP: Duración del interpulso.	46
Figura 14	Eritrocitos de A) adultos de <i>O. cordobae</i> ; B) juveniles y C) adultos de <i>O. americanus</i> .	50

Figura 15	Comparación del tamaño celular de juveniles y adultos de <i>O. americanus</i> y adultos de <i>O. cordobae</i> . Las equis indican el promedio y las barras verticales el correspondiente intervalo de confianza (95%).	51
Figura 16	Comparación del tamaño nuclear de juveniles y adultos de <i>O. americanus</i> y adultos de <i>O. cordobae</i> . Las equis indican el promedio y las barras verticales el correspondiente intervalo de confianza (95%).	51
Figura 17	Regresión polinómica de segundo grado describiendo la relación entre el área de eritrocitos y el SVL de juveniles y adultos de <i>O. americanus</i> ($R^2 = 85.89 \%$).	52
Figura 18	Poblaciones de <i>Odontophrynus</i> relevadas dentro del área de estudio (Ver también Fig. 10). Rojo: <i>O. cordobae</i> ; verde: <i>O. americanus</i> .	56
Figura 19	Poblaciones de <i>Odontophrynus</i> relevadas dentro y cercanas al área de simpatria. Rojo: <i>O. cordobae</i> ; verde: <i>O. americanus</i> ; azul: sitios en sintopía.	57
Figura 20	Variación en el tamaño de área celular de los eritrocitos medidos en individuos de 14 localidades de la provincia de Córdoba. La barra horizontal indica la mediana, el rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.	58
Figura 21	Variación en el tamaño de área nuclear de los eritrocitos medidos en individuos de 14 localidades de la provincia de Córdoba. La barra horizontal indica la mediana, el rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.	58
Figura 22	Regresiones lineales entre el área nuclear y celular versus el SVL en <i>O. cordobae</i> (izquierda) y <i>O. americanus</i> (derecha). Los intervalos de confianza y predicción corresponden al 95%.	59
Figura 23	Cariotipos de <i>O. cordobae</i> pertenecientes a: (A) Elena; (B) Camino Oeste; (C) A° San Francisco; (D) La Escondida; y <i>O. americanus</i> de las localidades de: (E) La Escondida; (F) El Cano; (G) Espinillo; (H) Río Cuarto.	61
Figura 24	Ideograma construido en base a las medidas morfométricas	62

obtenidos sobre los cariotipos de individuos sintópicos de *O. cordobae* (gris) y *O. americanus* (negro). Se muestra la diferencia en el tamaño relativo de los grupos cromosómicos de ambas especies.

- Figura 25** Configuraciones meióticas observadas en individuos de *O. cordobae* de las localidades de: (A) Elena; (B) La Escondida; (C) A° San Francisco; (D) Camino Oeste; (E) Berrotarán; (F) Los Gigantes; y *O. americanus* pertenecientes a: (G) La Escondida; (H) El Cano y (I) Espinillo. 63
- Figura 26** Parámetros morfométricos medidos sobre ejemplares de *O. cordobae*, correlacionadas con las coordenadas latitudinales. 68
- Figura 27** Parámetros morfométricos medidos sobre ejemplares de *O. americanus*, correlacionadas con las coordenadas latitudinales. 68
- Figura 28** Segregación de individuos de las especies *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde). 71
- Figura 29** Segregación morfológica de los individuos alopátricos (círculos rellenos) y sintópicos (cuadrados vacíos) de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde), en base a las funciones discriminantes obtenidas. 73
- Figura 30** Diferenciación en base a la Tasa de Pulsos de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde) sintópicos. Los 6 individuos de la izquierda fueron analizados mediante citogenética. 74
- Figura 31** Oscilograma de un canto y pulsos de las especies *O. americanus* (izq.) y *O. cordobae* (der.). 75
- Figura 32** Regresiones entre cada variable acústica y la temperatura del agua para *O. cordobae* (izquierda) y *O. americanus* (derecha). 77
- Figura 33** Análisis de agrupamiento (UPGMA) mostrando las relaciones acústicas entre poblaciones de *O. cordobae*. 80
- Figura 34** Análisis de agrupamiento (UPGMA) mostrando las relaciones acústicas entre poblaciones de *O. americanus*. 80
- Figura 35** Segregación acústica de los individuos de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde), en base a las a los dos primeros componentes obtenidos. 82

Figura 36	Separación acústica en base a las variables de mayor peso en el Análisis discriminante considerando a todos los individuos (n=191) de <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	83
Figura 37	Gráficos de caja (Box Plots) mostrando la variación del parámetro tasa de pulsos en los grupos sintópicos y alopátricos dentro de cada especie y la diferenciación observada entre ellas. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la barra vertical indica la mediana, la línea horizontal muestra el rango y la cruz indica el promedio de la muestra.	86
Figura 38	Biplot de los CP 1 y 2 mostrando la relación entre las variables acústicas y la segregación de los individuos sintópicos de <i>Odontophrynus cordobae</i> (rojo) y <i>O. americanus</i> (verde).	87
Figura 39	Diferenciación entre individuos sintópicos de <i>O. cordobae</i> (rojo) y <i>O. americanus</i> (verde) considerando las variables DP y DIP (temperatura ajustada=20°C).	88
Figura 40	Biplot de los componentes principales 1 y 2 mostrando la relación entre las variables acústicas y la segregación de los individuos de <i>Odontophrynus cordobae</i> (rojo) y <i>O. americanus</i> (verde).	89
Figura 41	Segregación de los individuos sintópicos (cuadrados vacíos) y alopátricos (círculos rellenos) de <i>O. cordobae</i> (rojo) y <i>O. americanus</i> (verde) en base a los componentes principales 1 y 2.	90
Figura 42	Segregación acústica de los individuos sintópicos (cuadrados vacíos) y alopátricos (círculos rellenos) de <i>O. cordobae</i> (rojo) y <i>O. americanus</i> (verde). Las cruces negras indican los centroides.	91
Figura 43	Cantos de liberación (<i>release call</i>) de <i>O. cordobae</i> (izquierda) y <i>O. americanus</i> (derecha): Oscilograma del canto (arriba), espectrograma del canto (centro) y oscilograma de los pulsos (abajo).	92
Figura 44	Diferenciación entre los cantos de liberación de individuos <i>O. cordobae</i> (rojo) y <i>O. americanus</i> (verde) considerando las variables Duración del canto y Pulsos/canto.	93
Figura 45	Segregación acústica (cantos de liberación) de los individuos sintópicos (cuadrados vacíos) y alopátricos	94

(círculos rellenos) de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde). Las cruces negras indican los centroides.

- Figura 46** Posibles patrones de reconocimiento de señales y discriminación por parte de las hembras ante la presencia de estímulos coespecíficos y heteroespecíficos. Las líneas sólidas muestran la distribución de un determinado rasgo del canto de los machos de dos especies cercanamente relacionadas (“A” y “B”), y las líneas punteadas muestran la función de preferencia de las hembras de la especie “A” la cual podría resultar en uno de los cuatro patrones (A-D) propuestos. Tomado de Ryan y Rand (2001). **123**
- Figura 47** Gráficos de caja (Box plots) hipotéticos mostrando los cambios que sucederían en la variación y distribución de un atributo clave en las señales asociadas a la atracción de parejas de dos taxones cercanamente relacionados. A) Solapamiento de las distribuciones normales en poblaciones alopátricas antes de producirse el contacto; B) distribución sesgada asociada con el desplazamiento de caracteres reproductivos y el refuerzo durante las interacciones sintópicas iniciales; C) restauración de las distribuciones simétricas durante un equilibrio posterior, en sintopía. Tomado de Littlejohn (2001). **124**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Sitios de relevamiento de poblaciones del género <i>Odontophrynus</i> en el presente estudio.	27
Tabla 2	Resumen de las muestras obtenidas por sitio de captura para el análisis del tamaño de los eritrocitos de las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	37
Tabla 3	Número de individuos de <i>Odontophrynus</i> analizados mediante citogenética.	39
Tabla 4	Resumen de las muestras obtenidas por sitio de captura para el análisis morfométrico de las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	41
Tabla 5	Resumen de las muestras de individuos de <i>Odontophrynus</i> analizados mediante bioacústica.	44
Tabla 6	Promedio y desvío estándar de las mediciones realizadas sobre 40 eritrocitos pertenecientes a: 8 juveniles y 10 adultos de <i>O. americanus</i> y 10 adultos de <i>O. cordobae</i> .	49
Tabla 7	Promedio y desvío estándar de las mediciones realizadas sobre eritrocitos de individuos previamente cariotipados. n = número de individuos analizados. A = Alopátricos; S: Simpátricos.	53
Tabla 8	Promedio y desvío estándar de las mediciones realizadas sobre los núcleos de eritrocitos de individuos previamente cariotipados. n = número de individuos analizados. Se resaltan los sitios de sintopía.	54
Tabla 9	Promedio y desvío estándar de las mediciones realizadas sobre 40 eritrocitos de individuos de <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> pertenecientes a 14 localidades de Córdoba, Argentina. Se resaltan los sitios en sintopía.	55
Tabla 10	Descripción del análisis citogenético por sitio estudiado.	60
Tabla 11	Relación entre brazos (r), índice centromérico (i), y largo relativo de los cromosomas (RCL) de individuos sintópicos de <i>Odontophrynus americanus</i> y <i>O. cordobae</i> pertenecientes a la localidad de La Escondida.	62
Tabla 12	Valores promedio de las variables morfométricas por sexo y ANOVA entre sexos para <i>O. cordobae</i> (79♂/14♀) y <i>O.</i>	64

americanus (103♂/15♀).

Tabla 13	Valores promedio de 15 variables morfométricas registradas sobre los individuos de <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> (n=109) de 14 sitios. Se resaltan los sitios de sintopía.	65
Tabla 14	ANOVA para 15 variables morfométricas entre hembras de <i>O. cordobae</i> (n=14) y <i>O. americanus</i> (n=15).	66
Tabla 15	Prueba de normalidad ($\alpha=0.05$) de las variables morfométricas de <i>O. cordobae</i> (79♂) y <i>O. americanus</i> (103♂). W=estadístico Shapiro-Wilks.	66
Tabla 16	ANOVA/Kruskal-Wallis de 15 variables morfométricas entre las especies: <i>O. cordobae</i> (n=79♂), y <i>O. americanus</i> (n=103♂).	67
Tabla 17	Prueba de normalidad de 15 variables morfométricas de las dos especies. W representa el estadístico Shapiro-Wilks, p la probabilidad ($\alpha=0.05$).	69
Tabla 18	ANOVA/Kruskal-Wallis de 15 variables morfométricas entre las especies en sintopía (<i>O. cordobae</i> =15♂; <i>O. americanus</i> =33♂) y alopatria (<i>O. cordobae</i> =30♂; <i>O. americanus</i> =35♂).	70
Tabla 19	ANOVA/Kruskal-Wallis de 15 variables morfométricas entre individuos sintópicos (<i>O. cordobae</i> : n=15; <i>O. americanus</i> : n=33) y alopátricos (<i>O. cordobae</i> : n=30; <i>O. americanus</i> : n=35) dentro de cada una de las especies.	70
Tabla 20	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas para los individuos de: 1- <i>O. cordobae</i> ; 2- <i>O. americanus</i> .	71
Tabla 21	Segregación entre individuos sintópicos y alopátricos de las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> . Funciones discriminantes y Tabla de clasificación obtenidas en base a 15 variables morfométricas.	72
Tabla 22	Promedio y desvío estándar de las mediciones realizadas sobre series de canto de <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> pertenecientes a 22 sitios de la provincia de Córdoba, Argentina. n=n° de cantos analizados. Se resaltan los sitios de sintopía.	76
Tabla 23	ANOVA para cada variable acústica entre localidades	78

relevadas de cada especie.

Tabla 24	Grupos de localidades diploides homogéneas de acuerdo a un test a posteriori de Bonferroni (95%).	78
Tabla 25	Grupos de localidades tetraploides homogéneas de acuerdo a un test a posteriori de Bonferroni (95%).	79
Tabla 26	Promedio, desvío estándar y ANOVA entre especies para las variables acústicas (ajustadas a 20°C) registradas para el total de individuos de <i>O. cordobae</i> (n=70) y <i>O. americanus</i> (n=121).	81
Tabla 27	Análisis de Componentes Principales realizado en base a siete variables acústicas registradas en individuos de <i>O. cordobae</i> (n=70) y <i>O. americanus</i> (n=121).	81
Tabla 28	Tabla de clasificación obtenida a partir del Análisis Discriminante entre especies considerando 7 variables acústicas.	82
Tabla 29	Prueba de normalidad y ANOVA entre individuos sintópicos de <i>O. cordobae</i> (n=12) y <i>O. americanus</i> (n=20) para las variables acústicas ajustadas a 20°C. W representa el estadístico Shapiro-Wilks, p la probabilidad ($\alpha=0.05$).	85
Tabla 30	Prueba de normalidad y ANOVA entre individuos alopátricos de <i>O. cordobae</i> (n=21) y <i>O. americanus</i> (n=44) para las variables acústicas ajustadas a 20°C. W representa el estadístico Shapiro-Wilks, p la probabilidad ($\alpha=0.05$).	85
Tabla 31	ANOVA para las variables acústicas (ajustadas a 20°C) entre individuos sintópicos y no sintópicos dentro de cada especie.	86
Tabla 32	Análisis de Componentes Principales realizado en base a siete variables acústicas registradas en individuos sintópicos de <i>O. cordobae</i> (n=12) y <i>O. americanus</i> (n=20).	87
Tabla 33	Segregación de individuos sintópicos de las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> . Funciones discriminantes y Tabla de clasificación obtenidas en base a siete variables acústicas.	88
Tabla 34	Análisis de Componentes Principales realizado en base a siete variables acústicas registradas en individuos de <i>O. cordobae</i> (n=55) y <i>O. americanus</i> (n=78).	89

Tabla 35	Funciones discriminantes y Tabla de clasificación obtenidas en base a 7 variables acústicas para distinguir entre individuos sintópicos y no sintópicos de <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	90
Tabla 36	Distancias acústicas entre las poblaciones sintópicas y alopátricas de las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	91
Tabla 37	Valores promedios de los parámetros acústicos medidos sobre 145 cantos de liberación pertenecientes a 11 individuos de <i>O. cordobae</i> y 5 individuos de <i>O. americanus</i> .	92
Tabla 38	Distancias acústicas entre las poblaciones sintópicas y alopátricas de las especies <i>O. cordobae</i> y <i>O. americanus</i> .	94
Tabla 39	Morfología cromosómica en cariotipos de <i>O. cordobae</i> . Datos obtenidos a partir de este trabajo y de literatura existente.	102
Tabla 40	Morfología cromosómica en cariotipos de <i>O. americanus</i> . Datos obtenidos a partir de este trabajo y de literatura existente.	102

RESUMEN

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue la determinación de la presencia de poblaciones de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* para la identificación geográfica de zonas de sintopía y la evaluación de las diferencias inter e intraespecíficas.

El área de estudio comprendió una franja longitudinal norte-sur que abarca el centro-oeste de la provincia de Córdoba y noreste de San Luis. Se registraron individuos pertenecientes a 29 localidades incluyendo poblaciones sintópicas y alopátricas de ambas especies. Se registraron las series de cantos y las temperaturas del agua y sustrato in situ y se capturaron individuos para ser analizados en el laboratorio mediante morfometría, eritrometría y citogenética. Se analizaron en laboratorio un total de 222 individuos de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*. La determinación de ploidía se realizó mediante análisis citogenético y eritrometría. En este último caso se estableció un valor límite de tamaño celular y nuclear de eritrocitos para la determinación de especie. Se analizó la variación de los caracteres morfométricos y acústicos entre y dentro de cada especie. Para el análisis morfométrico se midieron 15 variables sobre 211 individuos y para el análisis bioacústico se analizaron siete parámetros sobre un total de 637 cantos de advertencia y 145 cantos de liberación de las especies estudiadas. El valor de área celular establecido para la separación de especies fue $192.45\mu\text{m}^2$ (prob.=99.83%) y el del área nuclear $24.02\mu\text{m}^2$ (prob.=99.08%). De los 21 sitios analizados mediante eritrometría, nueve registraron valores correspondientes a *O. cordobae* y 10 a *O. americanus*. En los dos sitios restantes se encontraron ejemplares diploides y tetraploides dentro de la misma muestra. El área celular promedio fue $163.66\mu\text{m}^2$ en diploides y $227.17\mu\text{m}^2$ en tetraploides mientras que el área nuclear promedio fue $19.75\mu\text{m}^2$ en *O. cordobae* y $32.05\mu\text{m}^2$ en *O. americanus*. Mediante citogenética se confirmó la ploidia de las poblaciones relevadas. En el análisis de los cariotipos elaborados se encontraron diferencias en la morfología de algunos grupos cromosómicos de los individuos sintópicos, respecto a los alopátricos en ambas especies.

En el análisis morfométrico no se observaron diferencias entre especies en el largo total, pero sí en el tamaño y forma de la cabeza. Dentro de cada especie, se encontraron mayores diferencias morfológicas entre poblaciones sintópicas y alopátricas en *O. americanus*. Entre especies, las poblaciones sintópicas mostraron una menor diferenciación que las poblaciones alopátricas. Estos resultados obtenidos mediante análisis univariado fueron similares a los observados en el análisis multivariado, donde los individuos sintópicos de ambas especies mostraron los porcentajes más bajos de reclasificación. En el análisis bioacústico se encontraron diferencias interespecíficas en todos los parámetros considerados, excepto en la frecuencia dominante. La separación entre las especies fue evidente también en los análisis multivariados. A partir de las funciones de clasificación arrojadas por el Análisis de Funciones Discriminantes se obtuvo una clasificación positiva de los individuos dentro de su respectiva especie de 99.48%. En el análisis intraespecífico, todos los parámetros mostraron diferencias significativas entre localidades dentro de cada una de las especies estudiadas (ANOVA; $p=0.05$). La variable Tasa de Pulsos mostró la mayor variabilidad entre poblaciones en ambas especies. Para este parámetro acústico, las poblaciones sintópicas se diferenciaron de la mayoría de sus respectivas poblaciones alopátricas coespecíficas. Esta distinción entre poblaciones sintópicas fue notable también en los análisis

multivariados. Las distancias acústicas calculadas confirmaron una mayor separación de las especies en sintopía.

La mayor diferenciación entre especies en alopatría que en sintopía, la ausencia de evidencias de combate activo entre machos y el menor tamaño de estos en relación a las hembras, podría sugerir que los caracteres morfológicos externos no tendrían una influencia importante en el reconocimiento y elección de pareja. Los resultados obtenidos en el análisis bioacústico parecerían ser consistentes con la hipótesis de desplazamiento de caracteres en el canto de advertencia de los individuos que habitan en zonas de contacto. Sin embargo, la selección podría haber actuado sobre la selectividad de las hembras mostrando un resultado similar. Por otra parte, teniendo en cuenta que existen fuertes diferencias también en alopatría, podría no existir ninguna fuerza actuando en este momento, y lo observado podría ser atribuido a la plasticidad de los individuos para moverse dentro de un rango de valores de un carácter.

La presencia de híbridos entre *O. cordobae* y *O. americanus* no ha sido reportada hasta el momento en la naturaleza. Cruces artificiales mostraron que el aislamiento reproductivo estaría basado en barreras pre-reproductivas y no en una viabilidad reducida de los híbridos. Los resultados muestran que las diferencias acústicas entre estas especies son fuertes y esto queda demostrado en la ausencia hasta el momento de evidencias de cruces erróneos. Sin embargo, debido a que los machos de estas especies presentan comportamiento satélite, se podrían producir apareamientos accidentales de parejas no coespecíficas que podrían dar origen a ejemplares híbridos. De encontrarse híbridos por esta causa, sería de esperar que se presenten en muy baja proporción.

ABSTRACT

The general aim of this Doctoral Thesis was the determination of the occurrence of *Odontophrynus cordobae* and *O. americanus* populations for the geographic identification of syntopy zones and the evaluation of inter- and intraspecific differences. The study area comprised a north-south longitudinal strip covering the center-west of Cordoba and the northeast of and San Luis provinces.

Individuals from 29 localities, included syntopic and allopatric populations of both species, were sampled. The advertisement calls and water and substrate temperature were registered in situ. Individuals were captured for analysis in the laboratory by morphometry, eritrometría and cytogenetics. A total of 222 individuals of the species *O. cordobae* and *O. americanus* were analyzed in laboratory. Ploidy determination was performed by cytogenetic and eritrometric analysis. In the latter case a limit value of cellular and nuclear size of erythrocytes was established for the species discrimination. The variation in morphometric and acoustic characters between and within species were analyzed. Fifteen morphometric variables were measured on 211 individuals. Seven acoustic parameters were analyzed on 637 advertisement calls and 145 release calls.

The value of cell and nuclear area established for the separation of species were $192.45\mu\text{m}^2$ (prob. = 99.83%) and $24.02\mu\text{m}^2$ (prob. = 99.08%) respectively. Of the 21 sites analyzed by eritrometría, nine reported values for *O. cordobae* and 10 for *O. americanus*. In the two remaining sites diploid and tetraploid individuals were found within the same sample. The average cell area was $163.66\mu\text{m}^2$ in diploid and $227.17\mu\text{m}^2$ in tetraploid, while the average nuclear area was $19.75\mu\text{m}^2$ in *O. cordobae* and $32.05\mu\text{m}^2$ in *O. americanus*. The ploidy of sampled populations was confirmed by cytogenetics. In the analysis of the karyotypes, differences in chromosome morphology between syntopic and allopatric individuals were observed in both species.

The morphometric analysis showed differences between species in the size and shape of the head, but not in total length. Within each species, major morphological differences were found between syntopic and allopatric populations of *O. americanus*. Between species, syntopic populations showed less differentiation than allopatric populations. These results obtained by univariate analysis were similar to those observed in the multivariate analysis, where syntopic individuals of both species showed the lowest percentages of reclassification.

Interspecific differences were found in all acoustic parameters, except in the dominant frequency. The separation between species was also evident in the multivariate analysis. A positive classification rate of individuals within their respective species of 99.48% was obtained. In the intraspecific analysis, all parameters showed significant differences among localities within each of the species studied (ANOVA, $P = 0.05$). The variable pulse rate showed the greatest variability among populations in both species. The syntopic populations differed from most of their conspecific allopatric populations for this acoustic parameter. This distinction between syntopic populations was also significant in multivariate analysis. The calculated acoustic distances confirmed a greater separation of the species in syntopy.

The greater differentiation between species in allopatry than in syntopy, the absence of evidence of active combat between males, and the smaller size of these in relation to females, might suggest that external morphological characters would not have a significant influence on the recognition and choice of partner. The results obtained in bioacoustics analysis appear to be consistent with the hypothesis of character

displacement in advertisement call of the individuals living in contact zones. However, the selection could have acted on the female selectivity showed a similar result. Moreover, considering the strong differences observed in allopatry could not be any force acting at this time, and the observed could be attributed to the plasticity of individuals to move within a range of values of a character.

The presence of natural hybrids between *O. cordobae* and *O. americanus* has not been reported so far. Artificial crosses showed that reproductive isolation would be based on pre-reproductive barriers, and not on a reduced viability of hybrids. Acoustic differences between these species are strong and this is demonstrated in the absence of evidence of mismatings. However, because the males of these species have satellite behavior, it could cause accidental heterospecific mating that could give rise to hybrid specimens. If there are hybrid for this cause would be expected to occur in very low proportion.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los anfibios anuros

Los anfibios representan el primer grupo de vertebrados que conquistaron el ambiente terrestre. Se originaron a partir de peces óseos (Osteichthyes) con aletas lobuladas, pertenecientes a la clase Sarcopterygii, durante el Período Devónico (aproximadamente 380 millones de años atrás). Los anfibios (del griego *amphi*=dos; *bio*=vida) presentan una característica única dentro de los vertebrados ya que la mayoría de los miembros de este grupo presentan un ciclo de vida bifásico desarrollando una parte de su vida debajo del agua y la otra parte sobre la tierra (Duellman y Trueb, 1986).

Los anfibios han explotado con éxito la mayoría de los ambientes terrestres permaneciendo estrechamente ligados al agua o a microhábitats húmedos para la reproducción (Vitt y Caldwell, 2009). Actualmente, se encuentran representados por tres clados, los órdenes Anura, Urodela y Gymnophiona, los cuales presentan diferencias morfológicas notables entre sí. Todos los anfibios comparten ciertas características fisiológicas que en conjunto los distinguen de otros vertebrados terrestres. Una característica es su piel sin escamas, muy permeable, que permite el paso rápido de agua y gases respiratorios. Esta característica dificulta su vida en ambientes salinos o en ambientes muy secos, aunque algunas especies han desarrollado adaptaciones espectaculares que permiten su existencia en hábitats extremos (Vitt y Caldwell, 2009). Sin embargo, se les permite hacer uso de la piel para la respiración en un grado mucho mayor que cualquier otro grupo de vertebrados. También tiene un efecto importante en su capacidad para mantener una temperatura corporal constante. Los anfibios son animales ectotérmicos, un rasgo fisiológico heredado de sus antepasados acuáticos. Ellos son incapaces de generar su propio calor corporal y por lo tanto presentan tasas metabólicas mucho más bajas que las de las aves y los mamíferos endotérmicos (Wells, 2007).

De los tres órdenes de anfibios, los anuros constituyen el grupo con mayor número de representantes y más ampliamente distribuido. Por ejemplo, en Argentina, habitan 171 especies de anuros distribuidas en 40 géneros (Lavilla *et al.*, 2000; Frost,

2011). En lo que se refiere al tipo de hábitat, los anuros están ampliamente distribuidos en el planeta habitando todo tipo de ambientes, desde regiones áridas y zonas montañosas hasta bosques tropicales, soportando un amplio rango de condiciones climáticas. Esta radiación experimentada por este grupo se relaciona con la adquisición a lo largo de la evolución de diferentes rasgos comportamentales, fisiológicos y morfológicos que permitió su diversificación y la colonización de diversas regiones del planeta.

Entre los anuros existen dos patrones básicos de reproducción. La mayoría de las especies tropicales o subtropicales son capaces de reproducirse a lo largo de todo el año; las precipitaciones parecerían ser en estos casos el factor extrínseco primario que controla el tiempo de actividad reproductiva. Por otra parte, para la mayoría de las especies que habitan en regiones templadas, la actividad reproductiva es cíclica y sería dependiente de la combinación entre temperatura y precipitaciones (Duellman y Trueb, 1986). Estas condiciones generan los momentos más favorables, tanto para los adultos reproductivos como para las larvas.

Durante el cortejo nupcial los machos, mediante la emisión del canto de advertencia (*advertisement call*), atraen a las hembras de su especie formando agregaciones reproductivas. Al producirse el encuentro de las parejas se lleva a cabo el amplexo, en el cual el macho abraza a la hembra induciendo la liberación de los óvulos. El amplexo puede ser axilar (como en la mayoría de los neobatracios) o inguinal, dependiendo de las especies. En contraste con los otros dos órdenes de anfibios, la mayoría de las especies de anuros presenta fecundación externa (Duellman y Trueb, 1986). Dependiendo de la especie la fecundación puede tener lugar en el agua, en tierra ó en estratos arbóreos. Así como existen diferentes lugares donde la hembra puede depositar los huevos para que simultáneamente el macho los fecunde, existen también diferentes modos en que la puesta de huevos puede ser depositada. Actualmente, existen 39 modos reproductivos que han sido registrados en los anfibios de todo el mundo y 16 modos para las especies presentes en Argentina, los cuales tienen una estrecha relación con los ambientes que éstas habitan (Lavilla y Rouges, 1992; Haddad y Prado, 2005).

El huevo de los anuros, como el de la mayoría de los anfibios, se encuentra encerrado por una membrana delgada y dura, la membrana vitelina. Esta membrana

proteínica, producida por los ovarios, es semipermeable y se encuentra rodeada por una serie de capsulas concéntricas secretadas por los oviductos (Salthe, 1965; Lofts, 1974; Duellman y Trueb, 1986). En anuros, los huevos no presentan una cáscara dura, como ocurre en los reptiles y las aves, y por lo tanto, pierde y gana el agua a través de su membrana con mucha rapidez. Incluso cuando los anuros se reproducen en tierra, debe poner sus huevos en microhábitats húmedos. Los anuros que ponen los huevos dentro del agua, así como algunos que ponen sus huevos fuera del agua, presentan larvas acuáticas que llevan vidas muy distintas a las de los anfibios adultos. Con el tiempo, pasan por una metamorfosis, que representa una importante remodelación de la morfología de los renacuajos en una forma adulta adaptada para la vida en la tierra (Wells, 2007).

Las poblaciones de anuros en muchas partes del mundo se encuentran en retroceso, y algunos grupos están desapareciendo por completo de su hábitat natural. Esta pérdida, reconocida como un fenómeno mundial desde 1990, merece la atención no sólo porque es preocupante en sí misma, sino también porque los anuros, como el resto de los anfibios, pueden servir como indicadores del estado general del medio ambiente (Blaustein y Wake, 1995). Stuart *et al.* (2004) publican los resultados obtenidos en las reuniones realizadas por la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) y el Global Amphibian Assessment (GAA), revelando la existencia actual de 5743 especies de anfibios en todo el mundo. En este trabajo se confirma que el status de conservación de los anfibios es alarmante. Aproximadamente 1856 especies (32.5% del total) se encuentran globalmente amenazadas, 2468 (43.2%) en declinación, 435 (7.6%) en rápida declinación, y 129 (2.2%) no poseen registros desde 1980.

Sin embargo, a pesar de la disminución de las poblaciones de anfibios en todo el mundo, el número de especies reconocidas dentro de este grupo se ha incrementado dramáticamente en los últimos años (ej.: Glaw y Köhler, 1998; Hanken, 1999; Meegaskumbura *et al.*, 2002; Martino y Sinsch, 2002; Köhler *et al.*, 2005; Ron *et al.*, 2006; Valetti *et al.*, 2009), haciendo de estos animales uno de los grupos de vertebrados con mayor tasa proporcional de descripción de nuevas especies (Hanken, 1999). Estas nuevas descripciones no son el resultado de cambios en los conceptos teóricos de especie, sino una consecuencia de (1) descubrimientos incipientes (taxones

fenotípicamente divergentes descriptos mediante las prácticas taxonómicas tradicionales), en particular debido a la exploración de zonas tropicales previamente poco conocidas (Köhler *et al.*, 2005), (2) diagnóstico con la ayuda de herramientas moleculares, y (3) la creciente aceptación de que una combinación de pequeñas diferencias en la morfología y la ecología (en la vocalización por ejemplo) pueden ser suficientes para caracterizar nuevos taxones de anfibios (Campbell y Savage, 2000) bajo los conceptos evolutivos y biológicos de especie (Fouquet *et al.*, 2007).

En muchos casos, el origen de nuevas entidades puede producirse a partir de cruces entre distintas especies o eventos causando una modificación del genoma en nuevos individuos (ej.: duplicación genómica), siendo esto relativamente común en el grupo de los anuros (ej.: Martino y Sinsch, 2002; Holloway *et al.*, 2006; Valetti *et al.*, 2009). A menudo, estos nuevos citotipos y las especies parentales tienden a mostrar una evolución morfológica conservadora (Cherry *et al.*, 1978), y la aplicación de herramientas genéticas y bioacústicas en estudios sistemáticos han sido particularmente efectivas al momento de revelar especies morfológicamente "crípticas" a partir de taxones que antes eran considerados como una sola especie (Bogart y Tandy, 1976; Hillis *et al.*, 1983; Highton, 1989; Wynn y Heyer, 2001; Martino y Sinsch, 2002; Valetti *et al.*, 2009).

1.2. Poliploidía y zonas de contacto diplo/poliploides

Cualquier desviación del número característico de cromosomas de un organismo en cualquier etapa de su ciclo de vida es denominada *heteroploidía*. Los cambios en el número de cromosomas que incremente o disminuya el número del genoma completo recibe el nombre de *euploidia*. La *poliploidía* es un tipo de *euploidía* que ocurre cuando un organismo posee tres o más genomas completos. Esta última definición resulta apropiada para organismos completos, órganos, tejidos o simples células (Jackson, 1976).

Este evento, que resulta de la multiplicación del material genético de los individuos, es un importante mecanismo evolutivo que hace posible una rápida producción de nuevas variantes permitiendo una potencial adaptación a cambios

ambientales repentinos y desfavorables para la existencia de especies o poblaciones (Kondo y Kashiwagi, 2004).

La poliploidización es uno de los pocos mecanismos que puede producir especiación instantánea (Holloway *et al.*, 2006). La evolución por poliploidía es un evento continuo y no raro dentro de los procesos macroevolutivos. Investigaciones en agricultura y sistemas naturales indican que los poliploides frecuentemente presentan novedades fisiológicas y características de historias de vida no presentes en el citotipo progenitor. De esta manera, la poliploidía ha jugado un rol importante en la evolución de muchos eucariotas (Soltis y Soltis, 1999). Las diferencias en ploidía han sido observadas entre congéneres relacionados e incluso dentro de especies (Otto y Whitton, 2000).

La poliploidía es extensamente reconocida como el principal mecanismo de adaptación y especiación en plantas (Ramsey y Schemske, 1998; Soltis y Soltis, 1999). En contraste, la especiación a través de poliploidía es rara en animales. Muller (1925), argumentó que esta diferencia podría ser causada por el desbalance en el número de cromosomas durante la gametogénesis de animales poliploides bisexuales, produciendo una segregación irregular durante la meiosis y resultando en la producción de intersexos y esterilidad. Sin embargo, la ocurrencia de especies poliploides bisexuales naturales en varias familias de anuros provee evidencias de que la poliploidización es un importante mecanismo de evolución en este grupo (Bogart, 1980; Tymowska, 1991; Beçak y Beçak, 1998).

Más de veinte especies de anuros muestran un rango de ploidía que varía de $3n$ a $12n$ y varias de ellas presentan pares constituidos por diploides y su contraparte tetraploide (Ej.: *Hyla chrysoscelis*, $2n/H. versicolor$, $4n$ – Wasserman, 1970; Bogart y Wasserman, 1972; *Bufo viridis*, $2n/B. danatensis$, $4n$ – Pisanets, 1978; *Phyllomedusa distincta*, $2n/P. tetraploidea$ – $4n$ - Pombal y Haddad, 1992; etc.). La existencia de pares de especies crípticas diploide/poliploide, morfológicamente “idénticas”, indican autoploidización y evolución reciente y repentina. (Tymowska, 1991).

En anfibios anuros las diferencias en ploidía se encuentran generalmente asociadas con diferencias en la distribución geográfica y en el canto de advertencia, lo cual explicaría el aislamiento reproductivo entre taxones. Sin embargo, las zonas de

contacto entre citotipos con diferentes niveles de ploidía son particularmente interesantes para estudiar la ecología y la evolución de las interacciones reproductivas entre taxones relacionados. La hibridización, y en particular el mantenimiento de las zonas híbridas, tradicionalmente han recibido particular atención por su importante contribución al entendimiento de los patrones y procesos evolutivos. (Petit *et al.*, 1999).

Las zonas de contacto frecuentemente representan sitios activos del cambio evolutivo debido a que la hibridización y la introgresión podrían: a) incrementar la diversidad genética dentro de especies; b) causar la transferencia de adaptaciones genéticas; c) inducir el corte o la generación de barreras reproductivas entre grupos cercanamente relacionados; d) inducir la formación de nuevos ecotipos o especies. Además, las zonas de sintopía que presentan dos citotipos con diferentes niveles de ploidía, son de especial interés debido a que: pueden producir una elevada cantidad de individuos híbridos estériles, los cuales actúan como la principal restricción en las interacciones reproductivas entre los niveles de ploidía; reproducen ciertas condiciones que permiten el establecimiento de poliploides y finalmente, influyen en la dinámica de las poblaciones y fomentan la evolución de complejos de poliploides (Petit *et al.*, 1999).

Las zonas híbridas involucrando dos niveles de ploidía pueden resultar de dos procesos diferentes. Primero, ellas pueden formarse como una consecuencia directa de la emergencia de un neopoliploide dentro de una población diploide (origen primario de zona híbrida). Alternativamente, ellas pueden surgir por contacto entre poblaciones diploides y poliploides que se hallan geográficamente separadas y podrían haberse diferenciado en alopatría (origen secundario de zona híbrida). Una zona híbrida primaria puede resultar de dos procesos diferentes. Primero, un poliploide puede surgir y establecerse de una única especie diploide, o cuando hay contacto entre dos poblaciones de la misma especie diploide que se han diferenciado en alopatría. Este proceso evolutivo que involucra una única especie define a la autoploidía. Por otro lado, dos especies podrían hibridizarse, produciendo un aloploide. Cuando ocurre un contacto secundario, las poblaciones diploides y poliploides podrían acumular varias diferencias genéticas que no habrían surgido en circunstancias de un origen primario. En la mayoría de estas zonas híbridas, la distribución de citotipos es parapátrica y solo unos pocos híbridos son encontrados. En varias zonas de contacto diploide-autopoliploide, la

ausencia, o la leve diferenciación genética entre citotipos podrían indicar un reciente origen de los poliploides o un origen primario de la zona híbrida (Petit *et al.*, 1999).

Estudios recientes de zonas de contacto involucrando dos niveles de ploidía han provisto información con respecto a la evolución de diferentes mecanismos de aislamiento entre citotipos. La evolución del apareamiento selectivo (*assortative mating*) causando aislamiento precigótico puede resultar directamente de la poliploidización *per se* o por selección (como ocurre en el caso de los híbridos inviábiles). La selección por especialización ecológica en zonas híbridas diplo/poliploides podría limitar el intercambio de genes entre citotipos. Por otra parte, los mecanismos de aislamiento comportamental entre entidades con diferente nivel de ploidía han sido reportados en anfibios anuros. El aislamiento prerreproductivo entre pares de especies diplo/poliploides en anuros dependería principalmente de diferencias en la estructura del canto de advertencia (Gerhardt, 1994a; Stöck, 1998; Castellano *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1999; Martino y Sinsch, 2002).

1.3. El desplazamiento de caracteres

El contacto entre poblaciones parcialmente aisladas reproductivamente podrían tener varios posibles resultados: la extinción de una de las dos poblaciones, coexistencia estable con hibridación, la fusión de las dos poblaciones, o un aumento en la divergencia pre-reproductiva y formación de especies distintas (Liou y Price, 1994; Lemmon *et al.*, 2004). Dobzhansky (1940) postuló que si dos poblaciones divergentes producen híbridos de aptitud baja donde ellos entran en contacto, la selección natural reforzará el aislamiento pre-reproductivo. Blair (1955) denominó a este proceso como *refuerzo*. Mediante este proceso la selección fortalece las barreras de aislamiento precigótico en zonas de solapamiento o reduce la hibridización mediante la selección en contra de los híbridos. El desplazamiento de caracteres reproductivos es uno de los potenciales resultados de este proceso. Mediante este patrón se produce la acentuación de diferencias en rasgos del comportamiento reproductivo entre poblaciones simpátricas de especies cercanamente relacionadas, relativa a sus diferencias en poblaciones alopátricas (Brown y Wilson, 1956; Howard, 1993). En esta definición, el término rasgo

incluye tanto caracteres morfológicos como de sistemas de señales, así como también la capacidad de los individuos de cada especie para discriminar individuos coespecíficos y heterospecíficos (Gabor y Ryan, 2001).

Estos mecanismos de aislamiento prerreproductivo en zonas de simpatria refuerzan finalmente las barreras precigóticas, reduciendo de este modo la hibridización (Dobzhansky, 1937, 1940; Blair, 1955; Brown y Wilson, 1956). En zonas de solapamiento, donde la abundancia relativa de una especie tiende a declinar con la distancia desde las poblaciones parentales, se esperaría el desarrollo de un patrón de aumento gradual en el desplazamiento de caracteres reproductivos. Este patrón se acentuaría con el aumento de la distancia desde áreas con poblaciones alopátricas de la especie. Por otra parte, no se esperarían patrones regulares de desplazamiento de caracteres reproductivos en una zona de contacto en mosaico, debido a la naturaleza en parches de los cambios en la abundancia relativa de las especies (Benedix Jr y Howard, 1991).

Cuando el comportamiento reproductivo diverge entre poblaciones coespecíficas sintópicas y alopátricas, los individuos de poblaciones sintópicas podrían no aceptar coespecíficos de una población alternativa como parejas. En ese caso, estas poblaciones coespecíficas pueden aislarse reproductivamente, y ellos pueden sufrir finalmente como resultado la especiación (Howard 1993; Hoskin *et al.* 2005; Pfennig y Ryan, 2006).

1.4. Caracteres morfológicos y etológicos

El tamaño corporal y el canto de advertencia son reconocidos como los principales mecanismos que pueden causar aislamiento pre-reproductivo en anuros (Salas, 2004).

La morfometría representa un área fundamental de la investigación biológica, particularmente en aquellos estudios relacionados con descripciones cuantitativas, análisis e interpretación de forma o variación de formas (Rhoff, 1990). Los datos utilizados en análisis morfométricos son particularmente importantes y durante muchos años han servido como soporte para explicar fenómenos ecológicos y evolutivos y para la clasificación de nuevas especies, principalmente en los niveles taxonómicos más

bajos (Lee, 1982; Bernal y Clavijo, 2009).

Entre los patrones de apareamiento más comunes en la naturaleza se encuentra el apareamiento tamaño-selectivo, el cual se define como una correlación positiva entre el tamaño corporal de los machos y las hembras que se aparean (Ridley, 1983; Crespi, 1989; Rowe y Arnqvist, 1996; Taborsky *et al.*, 2009). Esto ha sido descrito en un amplio rango de taxones, incluyendo platelmintos (Vreys y Michiels, 1997), moluscos (Cruz *et al.*, 2004), anélidos (Michiels *et al.*, 2001), artrópodos (Crespi, 1989), peces (Kolm, 2002; Olafsdottir *et al.*, 2006), anfibios (Arak, 1983), reptiles (Olsson, 1993; Shine *et al.*, 2001), aves (Delestrade, 2001; Helfenstein *et al.*, 2004) y mamíferos (Preston *et al.*, 2005). Con mayor frecuencia es aceptado que el apareamiento por selección del tamaño resulta de la elección de parejas de mayor tamaño por parte de uno u otro sexo (Crespi, 1989; Harari *et al.*, 1999). La preferencia por las parejas más grandes se encuentra a menudo asociada con un potencial competitivo tamaño-dependiente que permitiría a los individuos más grandes obtener las parejas preferidas excluyendo a aquellos competidores físicamente inferiores (Crespi, 1989; Olsson, 1993; Harari *et al.*, 1999). En este sentido, el apareamiento con hembras grandes resulta beneficioso si éstas son más fecundas (Roff, 1992), o bien si depositan un mayor número de huevos o huevos de mayor tamaño (Kolm, 2001), mientras que las hembras podrían beneficiarse de aparearse con machos de mayor tamaño si estos últimos tuvieran mayor capacidad para defender o proveer recursos para las crías o contribuyeran con “buenos genes” para los descendientes (Riechert y Johns, 2003; Taborsky *et al.*, 2009).

Por otro lado, los mecanismos que no involucran necesariamente una elección de pareja han recibido poca atención a lo largo del tiempo, y se aplican solo bajo condiciones limitadas. En estos casos, la variedad de tamaño en las parejas 1) podría ser un sub-producto de una distribución correlacionada de los tamaños corporales de machos y hembras en el espacio o en el tiempo, o 2) puede surgir si limitaciones mecánicas hacen ineficiente o imposible el apareamiento con una pareja equivocada (Crespi, 1989; Brown, 1993; Otronen, 1993; Johannesson *et al.*, 1995). Sin embargo, la fuerza del aislamiento reproductivo basado en caracteres morfológicos podría verse debilitada en zonas de contacto involucrando citotipos morfológicamente similares. Las

especies crípticas, dos o más especies distintas clasificadas erróneamente como una única especie, son aquellas que son extremadamente similares en apariencia (morfología, fisiología y comportamiento) pero se hallan reproductivamente aisladas entre sí (Bickford *et al.*, 2007). Se considera que las especies crípticas podrían ser el resultado de un proceso reciente de diferenciación. Sin embargo, si la nueva especie permanece sujeta a presiones de selección muy similares, las dos especies podrían permanecer por un largo periodo de tiempo sin diferenciarse demasiado.

La similitud morfológica general y la variación intrapoblacional de las características morfológicas hacen que la identificación de especies en ciertos complejos de especies crípticas se convierta en una tarea difícil (Bickford *et al.*, 2007, Angulo y Reichle, 2008). Dado las dificultades asociadas con los complejos de especies crípticas, el uso de diferentes caracteres, como los comportamentales (Heyer y Reid, 2003; Kokubum y Giaretta, 2005), están siendo cada vez más usado para definir grupos taxonómicamente problemáticos (Angulo y Reichle, 2008).

Los patrones de evolución del comportamiento fueron un objetivo importante de los primeros estudios etológicos (Whitman, 1899; Lorenz, 1941) y el uso de comparaciones entre especies cercanas abordando preguntas sobre la evolución del comportamiento fueron desde siempre una preocupación de la etología tradicional (ej.: Kessel, 1955; Hinde y Tinbergen, 1958; Tinbergen, 1959; Huxley, 1966; Lorenz, 1966). Entre los temas de mayor interés abordados por los etólogos evolucionistas se encuentra sin dudas el estudio de la evolución de los mecanismos de reconocimiento específico, debido a su importancia en los procesos de especiación y selección sexual (Ryan y Getz, 2000). En la mayoría de las especies, los machos compiten por las oportunidades de apareamiento, y la comunicación juega un rol central en esta competencia (Kime *et al.*, 2004). La comunicación animal se logra a través de señales estereotipadas, que pueden transmitir información compleja a un receptor en relación con uno o más atributos del remitente (Hebets y Papaj, 2005). En este sentido, la comunicación es un proceso dinámico en el cual una señal emitida por un individuo puede influenciar el comportamiento de otro (Wiley, 1994). A menudo las interacciones comunicativas involucran el intercambio recíproco de señales, así como también cambios en las características de las mismas (Bradbury y Vehrencamp, 1998). La comunicación

relacionada con la elección de pareja juega un papel fundamental en la diversificación de especies y el aislamiento reproductivo (Mayr, 1976; Panhuis *et al.*, 2001; Streelman y Danley, 2003). Las señales se utilizan para reconocer y discriminar entre individuos co- y heteroespecíficos, lo que lleva a un apareamiento selectivo (Mayr, 1976; Littlejohn 1988; Wilczynski y Ryan, 1999).

Las señales acústicas de los anuros representan un excelente patrón de comportamientos para la realización de estudios comparativos (Cocroft y Ryan, 1995). Las vocalizaciones de los anuros representan uno de las actividades energéticamente más costosas que han sido registrados entre los vertebrados ectotérmicos (McNally, 1981; Taigen y Wells, 1985; Prestwich *et al.*, 1989; Wells y Taigen, 1989). Los machos, cuando cantan, experimentan un costo energético entre 10 y 25 veces respecto al costo energético de los mismos en reposo. En este sentido, la conservación de energía parecería ser el principal factor influyendo sobre las estrategias de canto de cada individuo (Schwartz *et al.*, 1995; Grafe, 1997).

Entre los anuros, han evolucionado varios mecanismos de canto. Como en la mayoría de los tetrápodos, el aparato laríngeo es el responsable de la producción de sonido, y en general puede ser visualizado como una capsula cartilaginosa (larínge) que aloja a las cuerdas vocales. El aparato laríngeo se encuentra ubicado entre los pulmones y la cavidad bucal (Duellman y Trueb, 1986). Además, la generación del canto en los anuros, incluye otro grupo de músculos denominados oblicuos externos e internos (Gans, 1974).

Las especies correspondientes al grupo de los Neobatracios, utilizan generalmente un flujo de aire espirado para generar el sonido (Wells, 2001). Los pulmones se llenan de aire previamente a la emisión del canto. Para ellos, la fuerza conductora es producida por la contracción de los músculos del tronco. Posteriormente, se producen ciclos de contracción y relajación de los músculos oblicuos, los cuales resultan en el paso, de ida y vuelta, de un volumen de aire entre el saco vocal y los pulmones. Los sacos vocales son divertículos de la cavidad bucal y podrían servir como resonadores, acopladores del sonido o radiadores acústicos (Wells, 2001). Cuando los músculos oblicuos externos e internos se contraen, empujan el aire fuera de la cavidad torácica y a través de la laringe. El flujo de aire hace que las cuerdas vocales y los cartílagos asociados vibren y se

produce un pulso de sonido (Emerson, 2001). La laringe podría abrirse pasivamente cuando una presión de aire crítica queda acumulada en los pulmones o, alternativamente, los músculos laríngeos podrían controlar activamente la apertura de la laringe (Girgenrath y Marsh, 1997).

Los músculos asociados con la producción de sonido son sexualmente dimórficos tanto en los parámetros fisiológicos como en masa, existiendo una variación inter e intraespecífica considerable en el grado de desarrollo de estos músculos del canto (Given y McKay, 1990; Pough *et al.*, 1992). Además, los machos muestran una variación intra e interespecífica sustancial en las características de sus cantos. La tasa de pulsos, la longitud y la frecuencia del canto pueden variar entre individuos aun cuando la temperatura y el tamaño corporal permanecen constantes entre ellos (Wells *et al.*, 1996).

Por otra parte, la distribución temporal de los cantos también muestra una notable variación intra e interespecífica. Algunas especies son reproductores explosivos, permaneciendo solo una o pocas noches vocalizando durante una estación reproductiva completa (ej.: Bevier, 1997). Otras especies vocalizan por periodos de tiempo prolongados abarcando varios días, semanas o meses (Bevier, 1997). Considerando una escala de tiempo sobre una misma noche, el esfuerzo de canto también varía dentro y entre especies. En algunas especies los machos cantan en distintos momentos de la noche alternando sus cantos con periodos variables de silencio (Wells, 1977; Schwartz, 1991). Frecuentemente los machos ajustan el tiempo y número de cantos en respuesta a los cantos de otros machos (Ryan, 1985).

En la reproducción de los anfibios, las emisiones acústicas constituyen un recurso de importancia al establecer el vínculo inicial entre los individuos, brindando información específica y permitiendo la atracción de la pareja (Blair, 1964; Littlejohn, 1965; Wells 1977; Ryan, 1985; Cocroft y Ryan, 1995). El canto de advertencia constituye casi un aspecto universal de la biología reproductiva de los anuros. Mínimamente, transmite información relacionada con la identidad específica del remitente, el género y la ubicación física (Erdtmann y Amézquita, 2009). Las presiones selectivas han afectado presumiblemente la evolución del canto a través de su rol en el reconocimiento de especie y la elección de pareja, llevando a una rápida divergencia de

las señales (Pfennig, 1998; Ryan y Rand, 1993; Boul et al., 2007). Así, el canto de advertencia actúa como un importante mecanismo de aislamiento pre-reproductivo entre especies simpátricas y por lo tanto, al ser un atributo específico de cada especie (Gerhardt y Davis, 1988), resulta un elemento de alto valor taxonómico.

1.5. El caso en estudio

A nivel mundial se han reportado al menos 25 especies de anuros que presentan algún nivel de poliploidía. En Argentina se encuentran cuatro de estas especies: *Odontophrynus americanus* ($4n=44$); *Ceratophrys ornata* ($8n=104$); *Pleurodema kriegi* ($4n=44$) y la recientemente descrita *Pleurodema cordobae* ($8n=88$). *O. americanus* y *C. ornata* presentan una contraparte críptica diploide, *O. cordobae* ($2n=22$) y *C. cranwelli* ($2n=26$) respectivamente, en tanto que *P. kriegi* y *P. cordobae* reflejan la misma situación pero como un complejo poliploide/poliploide. Estos tres complejos están presentes en el área central de Argentina y más precisamente en la provincia de Córdoba. Esta situación particular genera un escenario único para el estudio de los diferentes procesos ecológicos y evolutivos actuando sobre estos complejos de especies.

El tetraploide *O. americanus* ($4n=44$) de Brasil ha sido el primer caso citado de un poliploide natural en especies bisexuales (Sáez y Brum, 1959; Beçak et al., 1966; Bogart, 1967). Posteriormente, Beçak et al. (1970), destacan el hallazgo de una población diploide críptica de *O. americanus* del Brasil. Barrio y Pistol de Rubel (1972), analizan diferentes poblaciones diplo/tetraploides de *O. americanus* de Argentina y Uruguay, determinando la presencia de la forma diploide en la provincia de Córdoba. La condición tetraploide de *O. americanus* en dicha provincia fue registrada por Barale et al. (1981).

Martino y Sinsch (2002) analizaron poblaciones diploides y tetraploides de *O. americanus* en la zona central de Argentina con el objeto de evaluar si ellas representaban un par de especies crípticas o si todas las poblaciones pertenecían a la misma especie. Trabajando con variables morfométricas, bioacústicas y moleculares determinaron que se trataba de dos especies diferentes, nominando la nueva especie (diploide) como *O. cordobae*. El uso de diferentes caracteres independientes entre sí

permite una mejor aproximación hacia la interpretación y reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre especies (Martino y Sinsch, 2002).

Ruiz *et al.* (1981) encontraron individuos diploides y tetraploides en el mismo sitio de reproducción en diferentes temporadas en el estado de San Pablo, Brasil. Rosset *et al.* (2006) reportaron varias zonas de simpatria entre ejemplares diploides y tetraploides del género *Odontophrynus* en el norte de Argentina, aunque la mayoría de los datos de distribución fueron obtenidos de material de museo, por lo cual no se puede establecer que estas poblaciones se hayan encontrado realmente en sintopía y sincronía (colectadas en el mismo lugar y tiempo). Estos autores reportaron una única zona de sintopía comprobada por captura directa de ejemplares en la provincia de Corrientes, en donde encontraron un individuo tetraploide y seis individuos diploides del género *Odontophrynus* coexistiendo en una misma laguna.

En referencia a la presencia de híbridos naturales entre poblaciones diplo/tetraploides del género *Odontophrynus*, cruces artificiales exitosos realizados por Beçak y Beçak (1974) muestran que el aislamiento reproductivo estaría basado en barreras pre-reproductivas y no en una reducida viabilidad de los híbridos (Martino y Sinsch, 2002). Rosset *et al.* (2006) informaron el hallazgo de un ejemplar triploide en una población diploide de *Odontophrynus americanus* relevada en Misiones pero de acuerdo a la discusión de estos autores no se conocería con certeza el origen de su poliploidía.

Zonas de contacto entre el par de especies crípticas *O. cordobae* y *O. americanus* no han sido reportadas hasta el momento. De acuerdo a la distribución conocida de ambas especies (Martino y Sinsch, 2002), una de las áreas de interés para el relevamiento y estudio de zonas de contacto entre *O. cordobae* y *O. americanus*, potencial zona de simpatria, se encuentra demarcada geográficamente por un polígono determinado por las siguientes localidades: Río Cuarto (SE), Berrotarán (NE), Río de Los Sauces (NO), Alpa Corral (SO), en donde coexistirían ambas formas diplo/tetraploides.



2. OBJETIVOS

General

Determinar la presencia de poblaciones de las especies *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* en el área centro-oeste de la provincia de Córdoba para la identificación geográfica de zonas de sintopía y la determinación y evaluación de las diferencias inter e intraespecíficas.

Específicos

1. Identificar la presencia de poblaciones diploides y/o tetraploides mediante el uso de caracteres celulares (eritrometría y citogenética).
2. Determinar áreas de contacto entre poblaciones de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus*.
3. Analizar poblaciones alopátricas y simpátricas de las especies *O. cordobae* y *O. americanus* para evaluar si existe desplazamiento de caracteres en rasgos morfológicos (morfometría) y etológicos (bioacústica).
4. Evaluar la posible presencia de híbridos para establecer zonas de hibridización en áreas de simpatria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción de las especies en estudio

La nomenclatura utilizada en la clasificación de las especies en estudio fue tomada de Frost (2011):

Orden ANURA Fisher von Waldheim, 1813

Familia Cycloramphidae Bonaparte, 1850

Subfamilia Alsodinae Mivart, 1869

Género *Odontophrynus* Reinhardt y Lütken, 1862

1- *Odontophrynus americanus* (Dumèril y Bibron, 1841)

2- *Odontophrynus cordobae* Martino y Sinsch, 2002

3.1.1. El género *Odontophrynus* Reinhardt & Lutken, 1862

3.1.1.1. Taxonomía

Desde la descripción de la primera especie, *Odontophrynus cultripedes* (1862), el género *Odontophrynus* ha sufrido cambios de asignación en diferentes niveles taxonómicos, principalmente a nivel de familia. Inicialmente este género estuvo incluido dentro de la familia Leptodactylidae. Lynch (1971) consideró a esta familia dividida en cuatro subfamilias: Ceratophryinae, Elosiinae, Leptodactylinae y Telmatobiinae. Este autor incluyó al género *Odontophrynus* en esta última subfamilia, dentro de la tribu *Odontophrynini*. Heyer (1975) identificó, aunque no fueron reconocidas formalmente, cinco unidades dentro de la familia Leptodactylidae: Ceratophryinae, Eleutherodactylinae, Cycloramphinae, Leptodactylinae, and Telmatobiinae. Laurent (1896), siguiendo a Heyer (1975), incluyó al género *Odontophrynus* en la subfamilia Ceratophryinae junto con *Ceratophrys*, *Chacophrys* y *Lepidobatrachus*, dentro de la tribu *Ceratophryini*. Haas (2003) presentó evidencias morfológicas mostrando que las tribus *Ceratophryini* y *Odontophrynini* no serían parientes tan cercanos, con *Odontophrynus* más cercanamente relacionado a *Leptodactylus*, y el clado *Ceratophryini* (*Lepidobatrachus* y *Ceratophrys*) más cercano

a los hylidos, excluyendo a los hemiphractinos. Por su parte, Duellman (2003) consideró a los dos grupos como subfamilias, *Odontophryinae* y *Ceratophryinae*, presumiblemente siguiendo los resultados obtenidos por Haas (2003), y este criterio fue seguido posteriormente por Dubois (2005).

Recientemente, Frost *et al.* (2006), propusieron una revisión taxonómica de los diferentes grupos de anfibios mediante el uso de caracteres anatómicos (Haas, 2003) y análisis de ADN nuclear y mitocondrial, y reasignaron al género *Odontophrynus* dentro de la familia *Cycloramphidae*, subfamilia *Alsodinae*, junto a *Alsodes* (18 spp), *Eupsophus* (10 spp), *Hylorina* (1 spp), *Insuetophrynus* (1 spp), *Limnomedusa* (1 spp), *Macrogenioglottus* (1 spp) y *Thoropa* (5 spp). Por otra parte, *Ceratophrys*, *Chacophrys* y *Lepidobatrachus* fueron relocalizados en la familia *Ceratophryidae*, subfamilia *Ceratophryinae* (Frost *et al.* 2006).

Actualmente el género *Odontophrynus* se encuentra representado por diez especies reconocidas: *Odontophrynus americanus*, *O. cultripes*, *O. occidentalis*, *O. carvalhoi*, *O. barrioi*, *O. achalensis*, *O. lavillai*, *O. salvatori*, *O. cordobae* y *O. maisuma*. Las especies del género fueron divididas en 4 grupos de acuerdo a su morfología externa: *americanus*, *occidentalis*, *cultripes* y *moratoi* (Savage y Cei, 1965; Cei, 1987; Caramaschi, 1996), aunque recientemente Amaro *et al.* (2009) encontraron evidencias moleculares para trasladar a *O. moratoi* al género *Proceratophrys*.

El grupo *americanus* presenta en la actualidad cuatro especies, *O. americanus*, *O. lavillai*, *O. cordobae* y *O. maisuma*. Dentro de este grupo, la especie nominal *O. americanus* sufrió una serie de modificaciones en su denominación a lo largo del tiempo. Fue descrita en 1841 por Dumeril y Bibrón como *Pyxicephalus americanus*, cambiando su denominación a *Tomopterna americana* por Fitzinger en 1843. Posteriormente, Boulenger en 1882, nomina la especie como *Ceratophrys americana* y finalmente adquiere la denominación final de *Odontophrynus americanus* en 1920 por Miranda-Ribeiro, nombre que conserva hasta la actualidad. Recientemente, las poblaciones diploides *O. americanus* de la provincia de Córdoba fueron descritas como una nueva especie, *O. cordobae* (Martino y Sinsch, 2002).

3.1.1.2. Principales características morfológicas del género

Cei (1980) y Gallardo (1987) realizaron una descripción de las principales características anatómicas del género *Odontophrynus*, las cuales son enumeradas a continuación:

1-piel rugosa; 2-ausencia de osificaciones dérmicas en la cabeza ni en el escudo vertebral; 3-presencia de dientes pedicelados; 4-dedos de los miembros posteriores con membrana interdigital, 5-tímpano oculto; 6-ausencia de omosternum; 7-proceso transverso en las vertebrae presacras anteriores y posteriores cortos; 8-segunda vertebra vertebral libre; 9-ausencia de fontanela frontoparietal; 10-cóndilos occipitales poco separados; 11-cóndilos cervicales muy separados medialmente; 12- nasales no se encuentran en contacto con los frontoparietales (no ornamentados); 13-presencia de un sistema parótido-tibial con glándulas bien desarrolladas.

Dentro del género *Odontophrynus*, los miembros del grupo *americanus* se caracterizan por su coloración y patrón de glándulas, con ausencia de las glándulas post-orbitales, temporales y parótidas, aunque en algunos casos pueden observarse crestas alargadas en la región de las glándulas post-orbitales y parótidas (Savage y Cei, 1965; Cei, 1987).

3.1.1.3. Distribución geográfica

El género *Odontophrynus* es endémico de América del Sur y se encuentra ampliamente distribuido al sur y este del continente. Las especies *O. americanus* (Brasil, Uruguay, Paraguay y Argentina), *O. cultripes* (Brasil, Paraguay y citado para Argentina, individuos colectados hasta el presente), *O. maisuma* (Brasil y Uruguay) y *O. lavillai* (Brasil, Paraguay, Bolivia y Argentina) presentan una distribución compartida por varios países (Frost, 2011).

En Brasil se encuentran dos especies endémicas, *O. carvalhoi* en el nordeste y *O. salvatori* en el centro y sudeste del país. En Argentina habitan cuatro especies endémicas: con una distribución amplia en el país, *O. occidentalis* (zona noroeste y centro oeste del país); y con distribución restringida: *O. barrioi* (Sierras de Famatina, La

Rioja); *O. achalensis* (Pampa de Achala, Córdoba) y *O. cordobae* (principalmente asociada a las áreas serranas y pedemontanas de Córdoba, y sur de Santiago del Estero) (Ceí, 1972, 1980; Ruiz, 1980; Ceí y Crespo, 1982; di Tada *et al.*, 1984; Bridarolli y di Tada, 1996; Caramaschi, 1996; di Tada *et al.*, 1996; Martino y Sinsch, 2002; Rosset *et al.*, 2006; Frost, 2011).

Los ambientes en los cuales se distribuyen las diferentes especies del género presentan una importante variación en cuanto a sus condiciones climáticas y sus características naturales. Por ejemplo, *O. carvalhoi* se encuentra aislada de las demás especies y localizada a 1100 m de altitud aproximadamente, se distribuye dentro de la Región Neotropical, Dominio Chaqueño, Provincia de Caatinga. Ésta es una región semi-árida con una distribución de lluvias irregular que determinan la existencia de una vegetación xerófila. Por otra parte, *O. cultripes* y *O. salvatori* se distribuyen en los Dominios Amazónico y Chaqueño, Provincia del Cerrado, Paranaense y Chaqueña, entre los 500 y 900 m de altitud, con selvas subtropicales y bosques abiertos entre los que existen sabanas de gramíneas con arbustos y árboles aislados, llegando a regiones más llanas o ligeramente onduladas con clima templado (Caramaschi, 1996; Salas, 2004; Frost, 2011).

En el caso de *O. americanus*, la especie del género con distribución más amplia y con mayor variación en cuanto a los hábitats que ocupa, en Argentina habita desde regiones de montañas y valles, con vegetación de selva de transición hasta zonas de llanura con serranías bajas, en las cuales la vegetación se encuentra representada por bosques xerófilos, palmares y estepas gramíneas (Ceí, 1980; di Tada *et al.*, 1996; Martino y Sinsch, 2002; Rosset *et al.*, 2006).

Otra especie que ocupa diversos ambientes es *O. occidentalis*, la cual se distribuye en áreas montañosas áridas y semiáridas entre los 500 y 2000 m de altitud en las provincias de Catamarca, La Rioja, norte de Chubut, Río Negro y Neuquén, presentando poblaciones en las sierras de Córdoba y San Luis, así como también en la costa atlántica de Buenos Aires. La variedad de ambientes se encuentra asociada también a una variación en las condiciones climáticas. Por ejemplo, al norte de la distribución de la especie las precipitaciones son principalmente estivales, mientras que en el sur son más frecuentes las lluvias de invierno y primavera (Ceí, 1980; Ceí y

El componente 1 separa a los individuos de las dos especies y está correlacionado con las variables Tasa de Pulsos, Duración del Interpulso y Duración del Pulso (Tabla 27 y Fig. 35).

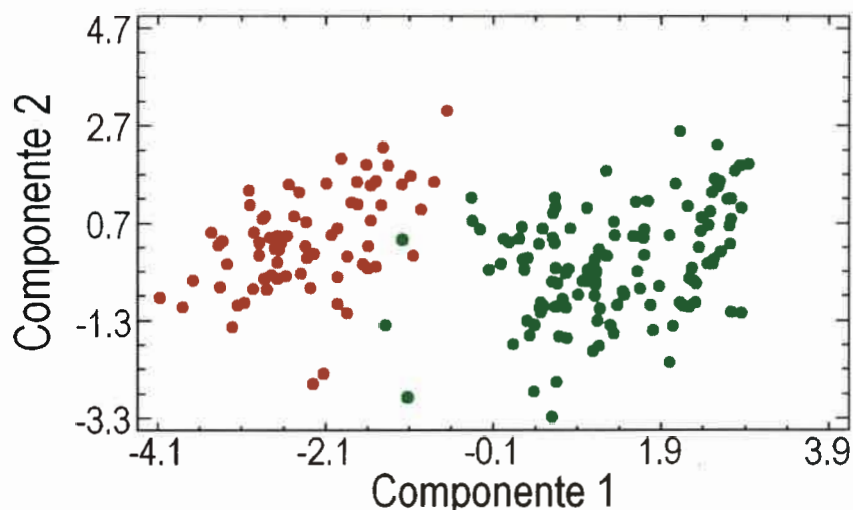


Fig. 35: Segregación acústica de los individuos de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde), en base a los dos primeros componentes obtenidos.

El Análisis Discriminante arrojó una función altamente significativa (Eigenvalor=9.15633; Corr. Can.=0.94949; λ de Wilks=0.09846; $p=0.0000$). Se obtuvo una clasificación positiva de los individuos dentro de su respectiva especie de 99.48% (Tabla 28). La función se encuentra correlacionada con las variables Tasa de Pulsos, Duración Interpulso y Pulsos por Canto (Fig. 36).

Tabla 28: Tabla de clasificación obtenida a partir del Análisis Discriminante entre especies considerando 7 variables acústicas.

Grupo actual	n	<i>O. cordobae</i>	<i>O. americanus</i>
<i>O. cordobae</i>	70	69 (98.57%)	1 (1.43%)
<i>O. americanus</i>	121	0 (0.0%)	121 (100%)

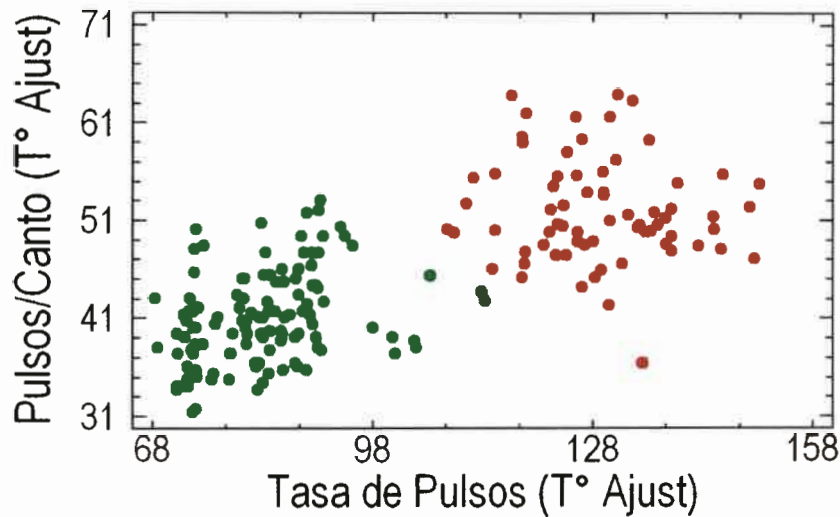


Fig. 36: Separación acústica en base a las variables de mayor peso en el Análisis discriminante considerando a todos los individuos ($n=191$) de *O. cordobae* y *O. americanus*.

4.4.1.3. Análisis del patrón de variación acústica

El test de Mantel comparando las distancias geográficas entre las localidades consideradas y las distancias acústicas no fue significativo en *O. cordobae* ($r=0.106$; p [random $Z < \text{observed } Z$] = 0.748). Debido a que dentro de las poblaciones diploides existe un rango de altitud relativamente amplio (550-1450 m.s.n.m.) se analizó además la relación entre esta variable y el canto.

La asociación entre las matrices de distancias altitudinales y acústicas tampoco resultó significativa para esta especie (Mantel test; $r = -0.093$; p [random $Z < \text{observed } Z$] = -0.3631). La especie *O. americanus* tampoco mostró una asociación significativa entre las distancias geográficas y acústicas (Mantel test; $r = 0.101$; p [random $Z < \text{observed } Z$] = -0.6710).

Las regresiones realizadas entre cada parámetro acústico de *O. cordobae* y las coordenadas latitudinales mostraron una tendencia clinal en la duración del canto ($r=0.29$; $R^2=0.083$; $P<0.01$) y la duración del interpulso ($r=0.53$; $R^2=0.278$; $P<0.0001$) decreciendo de norte a sur, mientras que la tasa de pulsos ($r=-0.47$; $R^2=0.219$; $P<0.0001$) y el cociente de pulsos ($r=-0.53$; $R^2=0.28$; $P<0.0001$) evidenciaron un crecimiento en la misma dirección. Las variables frecuencia dominante ($r=-0.19$;

$r^2=0.038$; $P=0.081$), duración del pulso ($r=-0.15$; $R^2=0.021$; $P=0.1938$) y pulsos/canto ($r=0.005$; $R^2=0.00002$; $P=0.9634$) no estuvieron correlacionados con la latitud.

Posteriormente se comparó si las tendencias observadas continuaban cuando la población sintópica de La Escondida no era incluida. Se obtuvieron resultados diferentes para la duración del canto, la cual no mostró asociación significativa con la latitud ($r=0.18$; $R^2=0.032$; $P=0.1397$), y en la frecuencia dominante, que mostró un leve decrecimiento norte-sur ($r=0.27$; $R^2=0.071$; $P<0.05$). Los parámetros duración del interpulso ($r=0.37$; $R^2=0.136$; $P<0.01$) y tasa de pulsos ($r=-0.29$; $R^2=0.085$; $P<0.05$) mostraron tendencias clinales más leves cuando los individuos de La Escondida fueron removidos del análisis.

En la especie *O. americanus*, los parámetros duración de pulsos ($r=-0.28$; $R^2=0.078$; $P<0.01$), duración de interpulsos ($r=-0.42$; $R^2=0.179$; $P<0.0001$), frecuencia dominante ($r=-0.17$; $R^2=0.03$; $P<0.05$) y duración del canto ($r=-0.18$; $R^2=0.035$; $P<0.05$) mostraron un aumento clinal de norte a sur, mientras que las variables tasa de pulsos ($r=0.49$; $R^2=0.238$; $P<0.0001$), pulsos/canto ($r=0.23$; $R^2=0.054$; $P<0.01$) y cociente de pulsos ($r=0.23$; $R^2=0.051$; $P<0.05$) decrecieron en esa dirección.

Cuando las localidades sintópicas (La Escondida y El Cano) fueron removidas del análisis se obtuvieron diferencias en los resultados, debido a que no hubo asociación entre la latitud y las variables duración del canto ($r=-0.08$; $R^2=0.0067$; $P=0.40$), cociente de pulsos ($r=0.15$; $R^2=0.025$; $P=0.1024$), pulsos/canto ($r=0.15$; $R^2=0.022$; $P=0.1241$) y frecuencia dominante ($r=-0.18$; $R^2=0.03$; $P=0.0572$). Las variables duración de pulsos ($r=-0.19$; $R^2=0.038$; $P<0.05$), duración de interpulsos ($r=-0.24$; $R^2=0.062$; $P<0.01$) y tasa de pulsos ($r=0.35$; $R^2=0.126$; $P<0.001$) siguieron asociadas a la latitud pero esta asociación fue menos significativa.

4.4.1.4. Análisis de las diferencias entre poblaciones sintópicas y alopátricas

Para realizar una comparación acústica entre poblaciones alopátricas y sintópicas de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*, se utilizaron:

a) poblaciones alopátricas de la especie *O. cordobae* correspondientes a los sitios de Villa General Belgrano, Santa Rosa de Calamuchita, Los Gigantes, Villa Las Rosas,

Rodeo Viejo, Río de los Sauces y Berrotarán.

b) poblaciones alopátricas de la especie *O. americanus* correspondientes a los sitios de Baigorria, Espinillo, Los Membrillos y Río Cuarto.

c) poblaciones sintópicas correspondientes a los sitios de El Cano y La Escondida.

En el análisis univariado, los cantos pertenecientes a individuos sintópicos de *O. cordobae* y *O. americanus* presentaron diferencias significativas en todas las variables acústicas, excepto en la Frecuencia Dominante (Tabla 29). Los cantos pertenecientes a individuos alopátricos de *O. cordobae* y *O. americanus* presentaron diferencias significativas en seis variables acústicas, mientras que no fueron encontradas diferencias en el parámetro Frecuencia Dominante (Tabla 30).

Tabla 29: Prueba de normalidad y ANOVA entre individuos sintópicos de *O. cordobae* (n=12) y *O. americanus* (n=20) para las variables acústicas ajustadas a 20°C. W representa el estadístico Shapiro-Wilks, p la probabilidad ($\alpha=0.05$).

Variable	<i>O. cordobae</i>		<i>O. americanus</i>		ANOVA		Kruskal-Wallis Test	
	W	p	W	p	F	p	p	
Duración del Canto	0.90	0.18	0.94	0.25	12.45	0.0014	-	-
Pulsos/Canto	0.94	0.47	0.87	0.03	-	-	11.7698	0.0006
Frecuencia Dominante	0.95	0.60	0.94	0.21	0.19	0.6701	-	-
Duración de Pulsos	0.81	0.01	0.93	0.18	-	-	18.3333	0.0000
Duración de Interpulsos	0.96	0.77	0.94	0.30	92.74	0.0000	-	-
Tasa de Pulsos	0.85	0.03	0.95	0.41	-	-	21.8182	0.0000
Cociente de Pulsos	0.97	0.90	0.91	0.08	4.72	0.0378	-	-

Tabla 30: Prueba de normalidad y ANOVA entre individuos alopátricos de *O. cordobae* (n=21) y *O. americanus* (n=44) para las variables acústicas ajustadas a 20°C. W representa el estadístico Shapiro-Wilks, p la probabilidad ($\alpha=0.05$).

Variable	<i>O. cordobae</i>		<i>O. americanus</i>		ANOVA		Kruskal-Wallis Test	
	W	p	W	p	F	p	p	
Duración del Canto	0.93	0.01	0.98	0.77	-	-	47.078	0.0000
Pulsos/Canto	0.97	0.36	0.96	0.17	166.41	0.0000	-	-
Frecuencia Dominante	0.96	0.23	0.97	0.26	3.02	0.0854	-	-
Duración de Pulsos	0.93	0.02	0.98	0.64	-	-	69.2935	0.0000
Duración de Interpulsos	0.92	0.01	0.95	0.05	-	-	73.1178	0.0000
Tasa de Pulsos	0.95	0.13	0.91	0.00	-	-	73.3534	0.0000
Cociente de Pulsos	0.96	0.27	0.96	0.12	20.10	0.0000	-	-

En la comparación dentro de cada especie entre individuos sintópicos y alopátricos se encontraron diferencias significativas en cuatro variables para *O. cordobae* y seis variables para *O. americanus* (Tabla 31). De estos parámetros acústicos aquellos relacionados con la duración del pulso e interpulso fueron significativamente diferentes entre grupos para las dos especies (Fig. 37).

Tabla 31: ANOVA entre individuos sintópicos y no sintópicos dentro de cada especie para las variables acústicas ajustadas a 20°C).

Variable	<i>O. cordobae</i>				<i>O. americanus</i>			
	ANOVA		Kruskal-Wallis Test		ANOVA		Kruskal-Wallis Test	
	<i>F</i>	<i>p</i>		<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>		<i>p</i>
DC	-	-	2.5267	0.1119	8.72	0.042	-	-
P/C	3.32	0.0743	-	-	-	-	6.0040	0.0143
FD	1.19	0.2803	-	-	0.42	0.5188	-	-
DP	-	-	5.02492	0.0249	7.43	0.0080	-	-
DIP	-	-	24.12	0.0000	62.10	0.0000	-	-
TP	-	-	16.1167	0.0000	-	-	26.5171	0.0000
CP	10.40	0.0022	-	-	11.53	0.0011	-	-

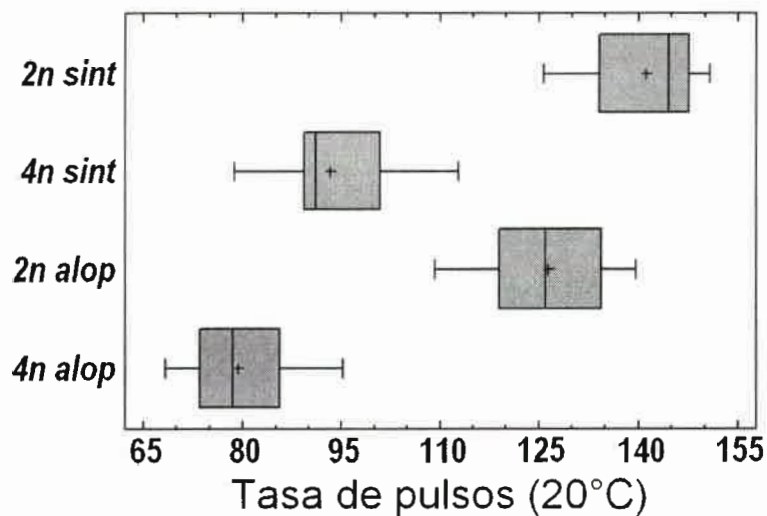


Fig. 37: Gráficos de caja (Box Plots) mostrando la variación del parámetro tasa de pulsos en los grupos sintópicos y alopátricos dentro de cada especie y la diferenciación observada entre ellas. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la barra vertical indica la mediana, la línea horizontal muestra el rango y la cruz indica el promedio de la muestra.

La Tabla 32 muestra los resultados del Análisis de Componentes Principales utilizando siete variables acústicas y considerando a los individuos sintópicos de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*.

Tabla 32: Análisis de Componentes Principales realizado en base a siete variables acústicas registradas en individuos sintópicos de *O. cordobae* (n=12) y *O. americanus* (n=20).

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
DC	0.297606	0.640302	-0.183632
P/C	-0.383042	0.482743	-0.26508
FD	-0.187	0.401564	-0.0477632
DP	0.427666	0.356997	0.368452
DIP	0.507648	0.0642935	-0.229604
TP	-0.473992	0.127116	-0.228574
CP	-0.253905	0.219043	0.80809
Eigenvalor	3.58368	1.43898	1.04741
% acum.	51.195	71.752	86.715

El CP 1, que separa a los individuos de las dos especies, está robustamente correlacionado con las variables Tasa de Pulsos, Duración de Interpulsos y Duración de Pulsos (Tabla 32, Fig. 38).

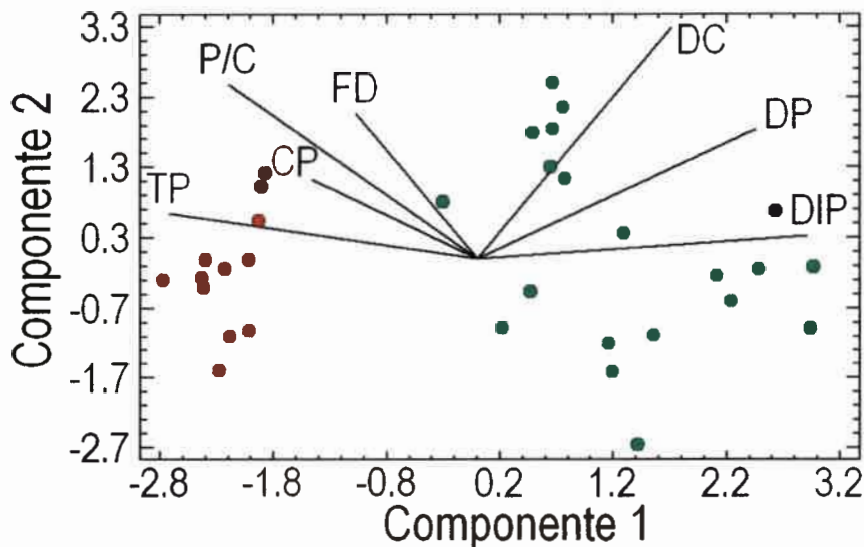


Fig. 38: Biplot de los CP 1 y 2 mostrando la relación entre las variables acústicas y la segregación de los individuos sintópicos de *Odontophrynus cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde).

Mediante un Análisis Discriminante realizado en base a siete variables acústicas se obtuvo una función altamente significativa (Tabla 33). La clasificación positiva de los individuos sintópicos dentro de su respectiva especie fue del 100%. Las variables con mayor poder discriminante fueron la Tasa de Pulsos y la Duración del Pulso (Tabla 33, Fig. 39).

Tabla 33: Segregación de individuos sintópicos de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*. Funciones discriminantes y Tabla de clasificación obtenidas en base a siete variables acústicas.

Función 1				Tabla de clasificación			
	Coef. estandarizados			Grupo actual	n	<i>O. cord.</i> Sint.	<i>O. amer.</i> Sint.
Eigenvalor	16.3051	CP	-1.9521	<i>O. cord.</i> Sint.	12	12 (100%)	0 (0.0%)
Correlación canónica	0.97068	TP	2.223939				
Lambda de Wilk	0.0577864	DC	-0.376967	<i>O. amer.</i> Sint.	20	0 (0.0%)	20 (100%)
χ^2	75.5515	P/C	1.09233				
d.f.	7	FD	-0.695717				
P	0.0000	DP	2.32661				
		DIP	-0.564742				

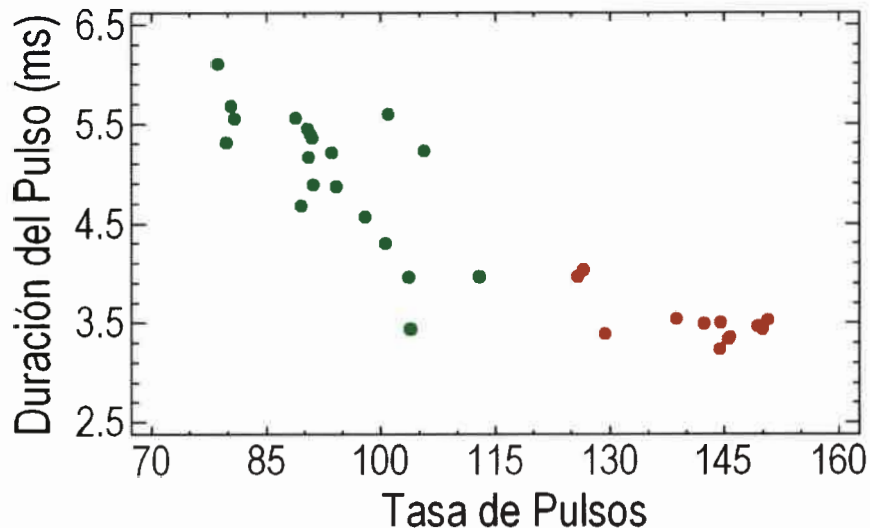


Fig. 39: Diferenciación entre individuos sintópicos de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde) considerando las variables DP y DIP (temperatura ajustada=20°C).

A partir del Análisis de Componentes Principales incluyendo a todos los individuos (sintópicos y alopátricos) de *O. cordobae* y *O. americanus* se extrajeron 2 componentes principales que explicaron un 76.44% de la variación total (Tabla 34).

El CP1, que separa a los individuos de las dos especies y a los ejemplares sintópicos de los alopátricos dentro de cada grupo, está compuesto principalmente por las variables referidas al bloque pulso-interpulso y su relación con la duración total del canto, expresada en la Tasa de Pulsos. El CP2, está fuertemente correlacionada con el Cociente de pulsos (DP/DIP) y con la única variable espectral registrada (Frecuencia Dominante) (Fig. 40 y 41).

Tabla 34: Análisis de Componentes Principales realizado en base a siete variables acústicas registradas en individuos de *O. cordobae* (n=55) y *O. americanus* (n=78).

	Componente 1	Componente 2
DC	0.383079	0.0919867
P/C	-0.355586	0.259366
FD	0.099598	0.677653
DP	0.424848	-0.35761
DIP	0.48357	0.072173
TP	0.48459	0.086119
CP	-0.260243	-0.569688
Eigenvalor	4.12956	1.22156
% acum.	58.994	76.445

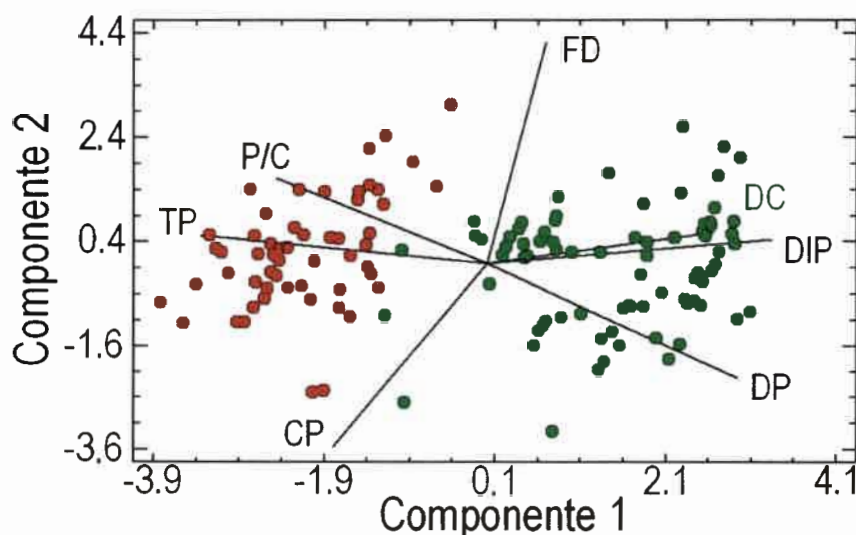


Fig. 40: Biplot de los componentes principales 1 y 2 mostrando la relación entre las variables acústicas y la segregación de los individuos de *Odontophrymus cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde).

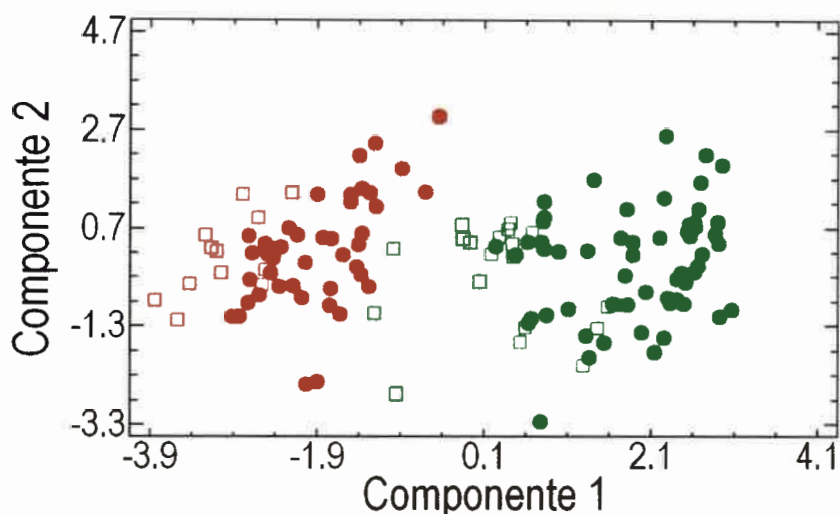


Fig. 41: Segregación de los individuos sintópicos (cuadrados vacíos) y alopátricos (círculos rellenos) de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde) en base a los componentes principales 1 y 2.

A partir del Análisis Discriminante realizado en base a siete variables acústicas considerando los cuatro grupos (sintópicos y no sintópicos de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*) se obtuvo una clasificación positiva de los individuos del 82.71% (Tabla 35). La Función 1, que segregó a los individuos de las dos especies y a individuos sintópicos y alopátricos de *O. cordobae*, estuvo compuesta principalmente por las variables Tasa de Pulsos y Pulsos por Canto, mientras que las variables con mayor poder discriminante dentro de la Función 2, que separa a los individuos sintópicos y no sintópicos de *O. americanus*, fueron el Cociente de Pulsos y la Duración del Pulso (Tabla 35, Fig. 42).

Tabla 35: Funciones discriminantes y Tabla de clasificación obtenidas en base a 7 variables acústicas para distinguir entre individuos sintópicos y no sintópicos de *O. cordobae* y *O. americanus*.

	Función		Coef. Estandarizados		Tabla de clasificación					
	1	2	Función 1	Función 2	Grupo actual	n	<i>O. cord.</i> no sint.	<i>O. cord.</i> sint.	<i>O. amer.</i> no sint.	<i>O. amer.</i> sint.
Eigenvalor	13.3023	0.467116	DC	-0.931154 -40773	<i>O. cord.</i> no sint.	43	39 (90.7%)	4 (9.3%)	0	0
% relativo	95.86	3.37	P/C	1.20903 0.410246	<i>O. cord.</i> sint.	12	3 (25.0%)	9 (75.0%)	0	0
Correl. Can.	0.96441	0.56426	FD	0.002127 -0.015789	<i>O. amer.</i> no sint.	58	0	0	46 (79.3%)	12 (20.7%)
λ de Wilk	0.04305	0.61572	DP	0.95881 0.679278	<i>O. amer.</i> sint.	20	0	0	4 (20.0%)	16 (80.0%)
χ^2	397.8919	61.3485	DIP	0.891596 2.24396						
d.f.	21	12	TP	1.59767 1.59924						
P	0.0000	0.0000	CP	-0.104197 0.421831						

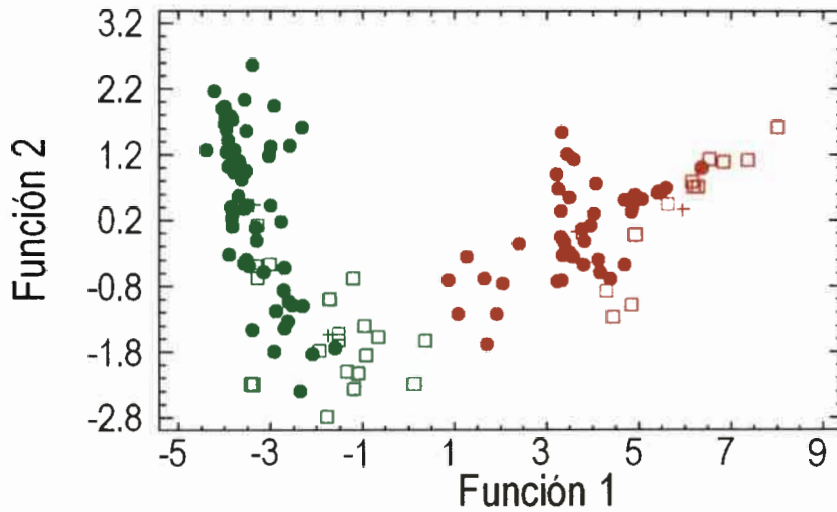


Fig. 42: Segregación acústica de los individuos sintópicos (cuadrados vacíos) y alopátricos (círculos rellenos) de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde). Las cruces negras indican los centroides.

Las distancias cuadradas de Mahalanobis entre grupos muestran una mayor diferenciación acústica entre las poblaciones sintópicas que entre las poblaciones alopátricas de ambas especies (Tabla 36).

Tabla 36: Distancias acústicas entre las poblaciones sintópicas y alopátricas de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*.

	<i>O. cordobae</i> sintópico	<i>O. americanus</i> sintópico	<i>O. cordobae</i> alopátrico	<i>O. americanus</i> alopátrico
<i>O. cordobae</i> sintópico	0.0000	65.40188	6.999968	90.13631
<i>O. americanus</i> sintópico	65.40188	0.0000	32.84739	6.735221
<i>O. cordobae</i> alopátrico	6.999968	32.84739	0.0000	51.06483
<i>O. americanus</i> alopátrico	90.13631	6.735221	51.06483	0.0000

4.4.2. Análisis de cantos de liberación (release call)

El canto de liberación de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* consiste de un único tren de pulsos, estructuralmente similar pero de menor duración total que sus respectivos cantos de advertencia (Fig. 43).

Los cantos de liberación de las dos especies difirieron en cinco de las siete variables consideradas (Tabla 37).

Tabla 37: Valores promedios de los parámetros acústicos medidos sobre 145 cantos de liberación pertenecientes a 11 individuos de *O. cordobae* y 5 individuos de *O. americanus*.

Variable	Especie		ANOVA	
	<i>O. cordobae</i>	<i>O. americanus</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Duración del canto (ms)	198.27	268.10	58.66	0.0000
Pulsos/canto (N)	28.00	26.12	2.25	0.1362
Duración del pulso (ms)	3.51	3.53	0.10	0.7578
Duración del interpulso (ms)	3.32	6.30	974.22	0.0000
Frecuencia dominante (Hz)	920.11	1006.44	23.05	0.0000
Tasa de pulsos (pulsos/s)	148.23	102.26	1594.53	0.0000
Cociente de pulsos	1.11	0.66	164.18	0.0000

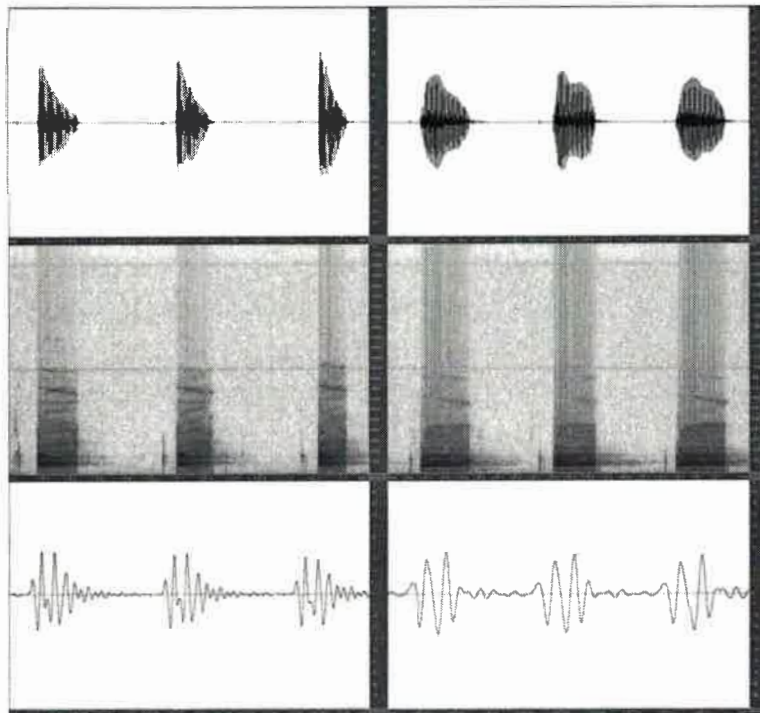


Fig. 43: Cantos de liberación (release call) de *O. cordobae* (izq.) y *O. americanus* (der.): Oscilograma del canto (arriba), espectrograma del canto (centro) y oscilograma de los pulsos (abajo).

El Análisis Discriminante realizado en base a las siete variables acústicas arrojó una función altamente significativa (Eigenvalor=5.79952; Corr. Can.=0.92354; λ de Wilks=0.147069; $p=0.0000$). La función obtenida se encuentra correlacionada con las variables duración del canto y pulsos/canto (Fig. 44). Se obtuvo una clasificación positiva de los individuos dentro de su respectiva especie de 97.93%.

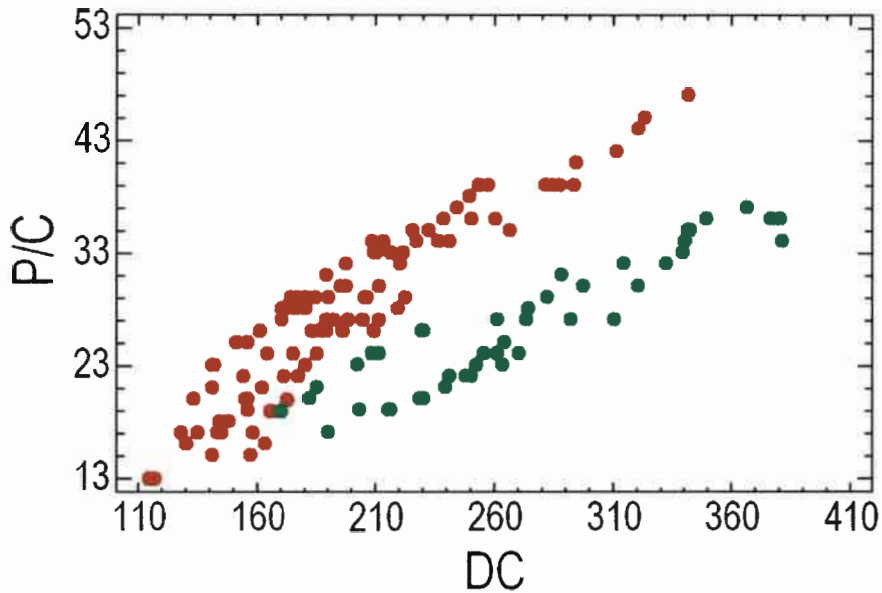


Fig. 44: Diferenciación entre los cantos de liberación de individuos *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde) considerando las variables Duración del canto y Pulsos/canto.

Cuando se separó a los grupos de cantos, dentro de cada especie, en sintópicos y alopátricos se obtuvieron 3 funciones discriminantes altamente significativas, de las cuales las primeras dos funciones explican un 94.5% de la variabilidad observada. La Función 1 (Eigenvalor=17.5007; Corr. Can.=0.97260; % relativo=82.02; λ de Wilks=0.00682121; $p=0.0000$), fuertemente asociada a la duración de pulsos, separa los cantos sintópicos y alopátricos de *O. cordobae*, y a los cantos sintópicos de ambas especies entre sí. La Función 2 (Eigenvalor=2.68653; Corr. Can.=0.85366; % relativo=12.59; λ de Wilks=0.126197; $p=0.0000$), asociada al cociente de pulsos, separa a los cantos sintópicos de los alopátricos dentro de *O. americanus* (Fig.45). La reclasificación obtenida en este caso fue de 97.93%, con una clasificación del 100% de los cantos de individuos sintópicos de ambas especies dentro de su respectivo grupo.

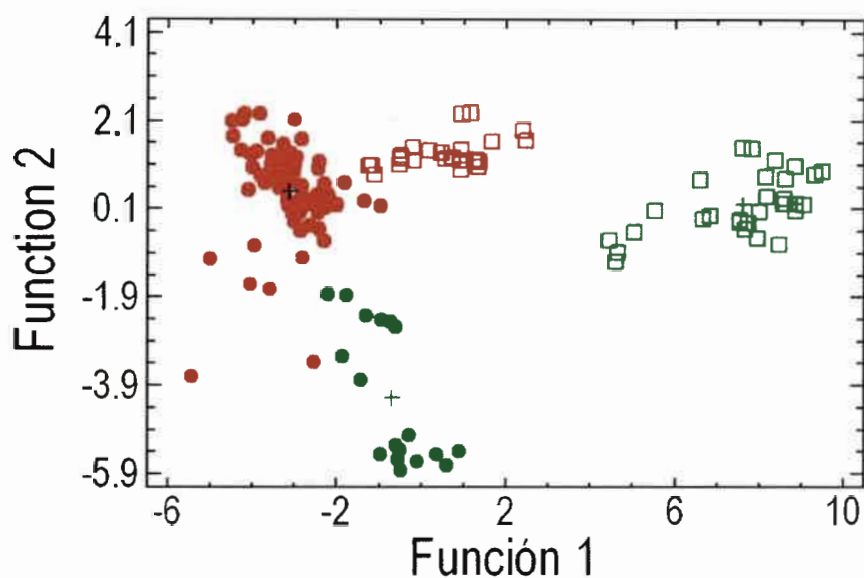


Fig. 45: Segregación acústica (cantos de liberación) de los individuos sintópicos (cuadrados vacíos) y alopátricos (círculos rellenos) de *O. cordobae* (rojo) y *O. americanus* (verde). Las cruces negras indican los centroides.

Las distancias cuadradas de Mahalanobis entre grupos muestran una mayor diferenciación acústica entre las poblaciones sintópicas que entre las poblaciones alopátricas de ambas especies (Tabla 38).

Tabla 38: Distancias acústicas entre las poblaciones sintópicas y alopátricas de las especies *O. cordobae* y *O. americanus*.

	<i>O. cordobae</i> alopátrico	<i>O. americanus</i> alopátrico	<i>O. cordobae</i> sintópico	<i>O. americanus</i> sintópico
<i>O. cordobae</i> alopátrico	0.0000	30.21217	22.69294	118.6945
<i>O. americanus</i> alopátrico	30.2122	0.00000	35.74500	92.1227
<i>O. cordobae</i> sintópico	22.6929	35.74500	0.00000	61.1355
<i>O. americanus</i> sintópico	118.6945	92.12267	61.13549	0.0000

5. DISCUSIÓN

Durante el transcurso del presente trabajo se registraron 29 sitios de actividad reproductiva para el par de especies crípticas diplo/tetraploides *Odontophrynus cordobae/O. americanus*. Estos sitios corresponden, en su gran mayoría, a charcas temporarias que resultan de las lluvias intensas e inundaciones que se producen durante las estaciones de primavera y verano.

De los 29 sitios relevados, 21 representan nuevos puntos de distribución para las especies de *O. cordobae* y *O. americanus*. Las poblaciones diploides/tetraploides de las localidades consideradas fueron diferenciadas en base a un complejo de caracteres independientes.

Dos de los sitios relevados corresponden a áreas reducidas de reproducción en donde fue posible registrar individuos de ambas especies en coexistencia y reproduciéndose de forma simultánea. Este significativo hallazgo corresponde a dos zonas de contacto situadas en las localidades de El Cano y La Escondida, localidades ubicadas al suroeste de la provincia de Córdoba.

Hasta el presente, nunca fue posible el hallazgo de individuos híbridos en las zonas de sintopía. En este sentido, se evaluó el grado de diferenciación en los caracteres morfométricos y acústicos entre poblaciones alopátricas y simpátricas, con la finalidad de detectar un posible desplazamiento de caracteres que refuerce el aislamiento reproductivo entre las especies *O. cordobae* y *O. americanus* coexistiendo en sintopía.

5.1. Eritrometría

5.1.1. Análisis del tamaño de eritrocitos en individuos juveniles y adultos

Diferencias morfológicas entre los eritrocitos de larvas y adultos han sido observadas en numerosas especies de anuros (Duellman y Trueb, 1986). Durante la metamorfosis, las grandes células sanguíneas de las larvas son reemplazadas por

eritrocitos más pequeños en los adultos (Broyles, 1981). Sin embargo, no existe información sobre el tamaño de los eritrocitos en ejemplares juveniles. Las especies estudiadas son cripticas y en estado juvenil no emiten cantos de advertencia (carácter usado en el reconocimiento de las especies de anuros). Resultaba entonces necesario examinar si la eritrometría podía utilizarse para la diferenciación de las especies *O. cordobae*/*O. americanus* indistintamente de si los individuos fueran adultos o juveniles. El análisis realizado sobre eritrocitos de ejemplares juveniles de *O. americanus* reveló una elevada variabilidad intra-individuo en el tamaño nuclear y celular. Algunos individuos juveniles y adultos mostraron valores de área solapados. Sin embargo, las medidas promedio obtenidas a partir de 40 eritrocitos representarían una estimación correcta del tamaño celular y nuclear de cada individuo (Rosset *et al.*, 2006; Grenat *et al.*, 2009a).

En la comparación entre especies, el tamaño de los eritrocitos medidos en juveniles de *O. americanus* (tetraploides) están dentro o cercanos al rango obtenido para ejemplares adultos de *O. cordobae* (diploides) y la mayoría de los valores son marcadamente diferentes respecto al valor mínimo de área de eritrocitos encontrados en adultos de *O. americanus* (tetraploides). El tamaño nuclear de los tetraploides juveniles fue, sin embargo, significativamente mayor que en los diploides adultos. Este resulta un punto importante debido a que varios estudios llevados a cabo con pares o grupos de especies diplo/tetraploides usan el tamaño celular y no el tamaño nuclear para diferenciarlos (ej.: Stöck y Grosse, 1997; Stöck *et al.*, 1999; Martino y Sinsch, 2002; Christiansen *et al.*, 2005).

Los glóbulos rojos circulantes de larvas pre- y post-metamórficas contienen hemoglobina de tipo larval, mientras que los eritrocitos de juveniles post-metamórficos y adultos contienen hemoglobina de tipo adulto. Al comienzo del clímax metamórfico, aparecen las nuevas células conteniendo hemoglobina de tipo adulto y dos tipos de eritrocitos coexisten en el sistema circulatorio, hasta que las células conteniendo hemoglobina de tipo larval desaparecen al final del clímax metamórfico (Dorn y Broyles, 1982). Aunque no ha sido establecido que estos cambios en el tipo de hemoglobina representen un reemplazo de las poblaciones de eritrocitos, es posible que las células con hemoglobina larval sean removidas de la circulación sistémica por un

proceso apoptótico (Hasebe *et al.*, 1996). Considerando el largo total (SVL) de los individuos analizados, se esperaría que un reemplazo total de eritrocitos larvales por eritrocitos adultos (o al menos post-larvales) haya ocurrido, pero serían necesarios estudios acerca del tipo de hemoglobina que estos contienen para una demostración fehaciente. Se ha observado que la forma de las células de los individuos juveniles estudiados fueron uniformes entre ellas y no variaron con respecto a la forma observada en ejemplares adultos, sugiriendo que no habría una mezcla de eritrocitos larvales y post-larvales.

Benbassat (1974) observó un marcado aumento en la síntesis de hemoglobina durante el clímax metamórfico en *Rana catesbeiana*. En esta especie las células circulantes de las larvas en esta etapa de la metamorfosis produce principalmente hemoglobina adulta y, relativamente, pequeñas cantidades de hemoglobina larval. La etapa posterior consiste en la declinación gradual en la producción de hemoglobina por los eritrocitos en el curso de la maduración de los juveniles (Benbassat, 1974). Así, las diferencias en el tamaño de los glóbulos rojos entre juveniles y adultos resultarían de la concentración de hemoglobina en la célula. Small y Davies (1970), sugirieron que en varios anfibios la cromatina condensada en eritrocitos nucleados maduros esta rodeada por hemoglobina nuclear en una concentración aproximadamente igual a la del citoplasma. Si esta asociación en la concentración de hemoglobina entre citoplasma y núcleo ocurre, podría explicar las diferencias en el tamaño nuclear entre juveniles y adultos de *O. americanus*. Las diferencias encontradas en el área nuclear entre juveniles y adultos de *O. americanus* fueron menores comparadas con las observadas en el área celular, aunque estas diferencias fueron significativas.

Considerando al eritrocito como el principal portador de oxígeno y dióxido de carbono, su relación superficie-volumen es un factor determinante en el intercambio de estos gases con los tejidos. Una célula pequeña ofrece la posibilidad de una tasa de intercambio mayor respecto a una célula de más grande (Hartman y Lessler, 1964). Existe una considerable variación en el contenido de hemoglobina por unidad de volumen de sangre obtenida de diferentes especímenes (Tooze, 1964). Varios autores han notado una relación inversa entre la tasa metabólica y el tamaño celular (Smith, 1925; Szarski, 1970, 1976; Gregory, 2002, 2003). Además una relación inversa entre el

tamaño y el número celular en anfibios y otros vertebrados ha sido reconocido (Smith, 1925), de tal manera que estas diferencias entre células podrían ser más exageradas cuando se observan a nivel de organismo (Gregory, 2003).

En relación al tamaño de los eritrocitos como un carácter diagnóstico, y de acuerdo a los resultados obtenidos, para lograr una correcta distinción entre *O. cordobae* y *O. americanus* se debe tener en cuenta el área nuclear y no el área celular de los eritrocitos cuando se consideren individuos tetraploides juveniles. Si bien exceden los objetivos del presente trabajo, estudios posteriores acerca del tipo y contenido de hemoglobina serían necesarios para analizar y explicar las causas de la variación en el tamaño de los eritrocitos durante la ontogenia de los individuos de *O. americanus*, y si estos resultados son evidenciados en otras especies de anuros.

5.1.2. Análisis del tamaño de los eritrocitos

La eritrometría, es decir la medición de los eritrocitos, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para la distinción de especies relacionadas que presentan diferentes niveles de ploidia (George y Lennartz, 1980; Matson, 1990; Stöck y Grosse, 1997; Schröer y Greven, 1998; Stöck *et al.*, 1999; Martino y Sinsch, 2002; Rosset *et al.*, 2006; Grenat *et al.*, 2009b). La mayoría de los autores basan las comparaciones del tamaño de eritrocitos sobre el área más que sobre el volumen, debido principalmente a que las células sanguíneas en los anuros son de forma elíptica y aplanada (Andrew, 1965; Foxon, 1964; Hartman y Lessler, 1964; Holtfreter, 1947; Matson, 1990).

En el presente estudio, mediante el análisis del área de los eritrocitos fue posible distinguir entre ejemplares de *Odontophrynus cordobae* (diploides) y *O. americanus* (tetraploides), pertenecientes a 21 localidades de la región centro-sur de la provincia de Córdoba. La relación aproximada entre las áreas de eritrocitos obtenidas de los individuos de *O. americanus* y *O. cordobae* fue de 1: 1,39. Esta tasa es mayor a la obtenida para estas especies por Martino y Sinsch (2002) utilizando ejemplares vivos (1:1.33). Rosset *et al.* (2006), obtuvieron una tasa considerablemente menor midiendo eritrocitos de individuos preservados (1:1.27). Martino y Sinsch (2002) reportaron

rangos con valores medios de área celular (*O. cordobae*: 143.3-176; *O. americanus*: 189-233.5 μm^2) que se encontraron incluidos dentro del rango obtenido en el presente estudio para *O. cordobae* (124.9-187.5 μm^2) y fueron levemente menores para *O. americanus* (198.5-281.3 μm^2). Por otro lado, el área promedio de eritrocitos obtenido por Rosset *et al.* (2006) sobre 10 ejemplares de *O. americanus* (ej.: área 120.6 μm^2) y 2 individuos de *O. cordobae* (ej.: área 84.4 μm^2) fueron considerablemente menores.

La relación aproximada entre el área nuclear de los eritrocitos de ejemplares diploides/tetraploides fue levemente mayor en el presente trabajo (1:1.62) respecto a la obtenida por Rosset *et al.* (2006), (1:1.57). Estos autores obtuvieron, al igual que lo reportado en el área celular, valores marcadamente menores en el área nuclear de ambas especies (*O. cordobae*: 11.9-12.6 μm^2 ; *O. americanus*: 16.1-19.8 μm^2) respecto a las obtenidas en el presente estudio. Esta diferencia está probablemente relacionada a que estos autores usaron animales preservados de museo para obtener las muestras de células sanguíneas.

Rosset *et al.* (2006) proponen el volumen nuclear como valor diagnóstico para la distinción entre ejemplares diploides y tetraploides del género *Odontophrynus*, y reportan valores límites para la distinción de las diferentes especies. Sin embargo, el cálculo del volumen nuclear fue obtenido por estos autores utilizando únicamente dos variables tomadas en un espacio plano (bi-dimensional), largo (a) y ancho (b) del núcleo (similares a las medidas utilizadas en el presente estudio), y utilizando la fórmula: $ab^2\pi/6$. Esta fórmula se utiliza para calcular el volumen de objetos con forma ovoide en donde las variables ancho y alto son iguales. Como se refirió anteriormente, los eritrocitos de los anuros presentan una forma elipsoide y plana, por lo que sería necesaria una medida de altura en un plano tri-dimensional para conocer su volumen real. Por lo tanto, en el cálculo de volumen realizado por estos autores solamente se sobreestima las diferencias encontradas con el cálculo del área nuclear.

La relación entre el tamaño de los eritrocitos y el tamaño corporal dentro de las especies no ha sido exhaustivamente estudiada en anfibios y los resultados obtenidos en aquellos trabajos que prueban esa relación son contradictorios. Szarski y Czopek (1966) reportaron que en *Rana catesbeiana*, los adultos con mayores pesos presentaron eritrocitos más grandes, y Church (1961) encontraron una relación directa entre el largo

corporal y el área de los eritrocitos de *Bufo melanostictus*. Por otro lado, Uzzell (1964) no encontró correlación entre el tamaño de las células sanguíneas y el tamaño corporal en el complejo de salamandras *Ambystoma jeffersonianum*. En el presente estudio no se encontró relación entre el largo hocico-cloaca y el área celular y nuclear de las especies *O. cordobae* ni *O. americanus*. Matson (1990) encontró una débil relación positiva entre el tamaño corporal y celular en el tetraploide *H. versicolor* pero no en su contraparte diploide *Hyla chrysoscelis*. Este autor considera que la relación entre el tamaño corporal y el área de los eritrocitos en anfibios es variable y probablemente pueda tener poca relevancia biológica.

Los resultados obtenidos, a partir de la evaluación realizada con el fin de obtener un valor límite que permita clasificar mediante el tamaño de los eritrocitos a individuos de *O. cordobae* y *O. americanus*, indicarían la importancia y eficiencia de este parámetro como carácter diagnóstico para la distinción de especies crípticas de anuros que poseen diferentes niveles de ploidía. La ventaja de este método radica en que es simple, rápida y mínimamente invasiva (Grenat *et al.*, 2009b). La eritrometría, contrario a la citogenética es un método que no requiere el sacrificio de los individuos analizados y representa una herramienta importante con un alto nivel de precisión para resolver problemas de distinción de ejemplares vivos de *O. cordobae* y *O. americanus*.

Sin embargo, aunque este método muestra un elevado nivel de precisión, la identificación de la ploidía debería ser considerado como predictivo más que como confirmativo (Matson, 1990). En este sentido, la confirmación mediante citogenética resulta necesaria en aquellos casos en donde los valores de área de eritrocitos o de sus respectivos núcleos se encuentren cercanos al valor límite previamente establecido.

5.2. Citogenética

Los estudios citogenéticos han permitido realizar valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo. Las características estructurales y cuantitativas de los cromosomas (cariotipo) son importantes en investigaciones básicas (taxonómicas y evolutivas) y aplicadas. Los taxónomos y evolucionistas están familiarizados con el hecho de que los cromosomas son parte de un sistema dinámico que está moldeando el proceso de evolución. Esta variación se expresa en características fácilmente analizables como el número, forma y tamaño de los cromosomas y no está relacionada con complejidad genética u orgánica (Poggio y Naranjo, 2004). Variaciones en el cariotipo pueden ocurrir sin cambios notorios en el exofenotipo. Sin embargo rearrreglos en condición heterocigota pueden ocasionar disturbios en el apareamiento meiótico e iniciar aislamiento reproductivo. Si se dan las condiciones adecuadas para la fijación de estos rearrreglos pueden iniciarse eventos especiogénicos que involucren rearrreglos cromosómicos. Estos procesos pueden conducir, en algunos casos, a la existencia de especies crípticas o hermanas, con pocas diferencias a nivel bioquímico o morfológico pero con diferencias cromosómicas que las mantendrían aisladas reproductivamente (Poggio y Naranjo, 2004).

Los aspectos citogenéticos del género *Odontophrynus* fueron extensamente estudiados desde la década de 1960 (ej: Beçak *et al.*, 1966; Beçak *et al.*, 1970; Barrio y Pistol de Rubel, 1972; Beçak y Beçak, 1974; Ruiz, 1980; Schmid *et al.*, 1985; Salas, 2004, 2006; Rosset *et al.*, 2006; Salas y Martino, 2007). Las especies del complejo *O. americanus* presentan un número básico de cromosomas bibraquiales que consisten de cuatro elementos largos, tres medianos y cuatro pequeños. Las especie *O. americanus* presentaron un complemento tetraploide de $2n=4X=44$ cromosomas, mientras que *O. cordobae* posee un complemento diploide de $2n=2X=22$ cromosomas. Estos resultados están en acuerdo con los trabajos previos de Beçak *et al.*, 1966; Barrio y Pistol de Rubel, 1972; Ruiz, 1980; Schmid *et al.*, 1985; Salas, 2004, 2006; Rosset *et al.*, 2006. Desde el punto de vista citogenético, los cariotipos de los géneros antiguamente incluidos dentro de los leptodactílidos indican que el número cromosómico en el ancestro común del grupo es $2n = 26$ (Schmid *et al.*, 1985; Duellman y Trueb, 1986);

este número fue mantenido en los ceratófridos, en los cuales futuros cambios en el genoma fueron originados por poliploidización. Algunos otros leptodactílidos experimentaron una reducción en el número a $2n = 22$ cromosomas, presente en la mayoría de las especies de la familia Leptodactylidae, inclusive en el género *Odontophrynus* (Beçak *et al.*, 1966) actualmente dentro de la familia Cycloramphidae. El género *Odontophrynus* recibió especial atención, principalmente desde la constatación de la tetraploidía en *O. americanus* (Sáez y Brum, 1959, 1966) por poliploidización, y el posterior hallazgo de la forma diploide (Beçak *et al.*, 1970).

Los resultados obtenidos en el análisis citogenético mostraron que los pares 1-4, 6-7 y 10-11 conservan la misma morfología en todas las muestras estudiadas para las dos especies, excepto en el cariotipo de la localidad sintópica de La Escondida. Los cariotipos construidos para ambas especies fueron comparados con los cariotipos obtenidos para poblaciones diploides y tetraploides de *O. americanus* de Brasil y Uruguay y para *O. cordobae* y *O. americanus* de Argentina (Tablas 39 y 40).

Tabla 39: Morfología cromosómica en cariotipos de *O. cordobae*. Datos obtenidos a partir de este trabajo y de literatura existente.

Fuente		Par cromosómico										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Presente estudio	La Escondida	M	SM	SM	SM	M	M	SM	SM	SM	M	M
	restantes poblaciones	M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	M	M
Salas 2004, 2006		M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	M	M
Rosset <i>et al.</i> , 2006		M	M	SM	SM	M	M	M	SM	SM	SM	M
Beçak <i>et al.</i> , 1970, 1998		M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	M	M
Bogart y Wasserman, 1972		M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	SM	M

Tabla 40: Morfología cromosómica en cariotipos de *O. americanus*. Datos obtenidos a partir de este trabajo y de literatura existente.

Fuente		Grupo cromosómico										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Presente estudio	La Escondida	M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	M	M
	restantes poblaciones	M	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	M
Salas 2004, 2006		M	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	M	M
Rosset <i>et al.</i> , 2006		M	M	SM	SM	M	M	M	SM	SM	SM	M
Barale <i>et al.</i> , 1981		M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	SM	M
Barrio y Pistol de Rubel, 1972		M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	SM	M
Beçak <i>et al.</i> , 1966		M	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	M	M
Schmid <i>et al.</i> , 1985		M	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM	SM	M

La morfología de los pares o grupos de cromosomas presenta variaciones, más acentuadas en los cariotipos tetraploides, entre los diferentes estudios (Tablas 39 y 40). Estas variaciones podrían deberse a los criterios seguidos por los diferentes autores para la construcción de los cariotipos y a la ausencia de mediciones cromosómicas para una correcta clasificación morfológica de cada par o grupo cromosómico (Salas, 2006). Es necesario destacar que de los trabajos consultados solamente los pertenecientes a Salas (2004, 2006), y Schmid *et al.* (1985), presentan mediciones cromosómicas.

El cariotipo de *O. cordobae* perteneciente a la localidad sintópica de La Escondida muestra diferencias en la morfología del par 7 con respecto a los cariotipos confeccionados para las restantes localidades analizadas en el presente estudio y con los cariotipos diploides reportados en otros trabajos. Si bien solamente dos cariotipos diploides fueron construidos para esta localidad, resulta interesante observar variaciones en ambos cromosomas de un par que no muestra diferencias en su clasificación morfológica en la totalidad de poblaciones analizadas en los diferentes estudios. Poggio y Naranjo (2004) enfatizan que al igual que es frecuente y normal la existencia de variación cariotípica interespecífica, aunque menos frecuente, también puede existir variabilidad cariotípica intraespecífica manifestada como polimorfismos o politipismos cromosómicos. En este sentido, sería necesario en futuros estudios construir un mayor número de cariotipos de individuos pertenecientes a esta localidad para establecer, en base a la clasificación morfológica que se obtenga de este par cromosómico, si se repiten estas diferencias encontradas respecto a otras poblaciones de la misma especie.

Se observaron constricciones secundarias en cromosomas de ambas especies, correspondientes a diferentes localidades. Estas se distinguieron en cromosomas del par 4 pertenecientes a individuos de *O. cordobae*, y en cromosomas del par 11 en *O. americanus*. La localización de las constricciones secundarias en este complejo de especies es variable. Considerando la posición de las constricciones secundarias, en las entidades estudiadas del género *Odontophrynus* de Córdoba, estas podrían haber cambiado durante la evolución de las especies. Según Salas (2004), esto pudo ocurrir considerando un cariotipo ancestral diploide, con constricciones secundarias en el par 11, que por rearrreglos cromosómicos, podría haberse traslocado al par 4, dando lugar al cariotipo actual de *O. cordobae* (diploide) de las poblaciones de Córdoba. Por

recombinaciones cromosómicas, a través de la hibridización de animales con constricciones secundarias en el par 4 y otros con en el par 11, podrían haber dado lugar a *O. cordobae* con constricciones secundarias en ambos pares, tal como se describen algunos autores (Beçak *et al.*, 1970; Beçak y Beçak, 1974; Ruiz *et al.* 1981). En las poblaciones estudiadas de *O. cordobae* de Córdoba, las constricciones secundarias en el par 11 no se presentaron nunca (Salas, 2004). Los individuos de *O. americanus* (tetraploide) estudiados, presentan constricciones secundarias en los cromosomas homólogos del grupo 11, coincidente con lo observado en otras poblaciones cariotipadas (Beçak *et al.*, 1966; Beçak y Beçak, 1974; Barale *et al.*, 1981; Salas, 2004; Rosset *et al.*, 2006). Barrio y Pistol de Rubel, 1972 señalan la existencia de constricciones secundarias también en el grupo 4 para algunas poblaciones. Estos *O. americanus* tetraploides con constricciones secundarias en ambos grupos, podrían haberse originado por procesos de autotetraploidia de poblaciones diploides con constricciones secundarias en ambos pares (Salas, 2004). Más tarde, a través de la pérdida de los satélites del par 4, se habrían originado cariotipos de *O. americanus* con constricciones secundarias solamente en el grupo 11, (Beçak *et al.*, 1967, 1970; Beçak y Beçak, 1974; Bogart, 1980; Ruiz *et al.*, 1981) tal como es el caso de las poblaciones cariotipadas en este estudio. Rosset *et al.* (2006) reportaron que las constricciones secundarias en *O. americanus* se encuentran ubicadas en la región intersticial sobre el brazo corto de los cromosomas homólogos del grupo 11. Esto podría indicar actividad de transcripción diferencial o pérdida de genes ribosomales (Schmidtke *et al.*, 1976; Ruiz *et al.*, 1981, 1984; Lourenço *et al.*, 1998; Rosset *et al.*, 2006).

Se asume, a menudo, que los poliploides que forman bivalentes durante la meiosis han sufrido un proceso de aloploidia mientras que aquellos que forman multivalentes durante la meiosis son autoploidios (Otto y Whitton, 2000; Kondo y Kashiwagi, 2004). Durante la meiosis, la especie tetraploide es caracterizada por altas frecuencias de tetravalentes y por la homogeneidad entre cromosomas homólogos. Estos caracteres, sumados a la existencia de una contraparte críptica diploide morfológicamente similar, llevaron a algunos investigadores a considerar a esta especie un autoploidio de origen reciente (Beçak *et al.*, 1966; Bogart y Wasserman, 1972; Schmid *et al.*, 1985; Tymowska, 1991; Beçak y Beçak, 1998).

Es reportado que después que las nuevas especies poliploides quedan reproductivamente aisladas de su contraparte diploide parental, sufren un proceso de diploidización dando lugar a entidades que son diploides en términos de la cantidad de material genético y el número de loci, pero son tetraploides en términos del nivel de expresión génica, así como la morfología y el número cromosómico (Leipoldt, 1983; Kondo y Kashiwagi, 2004). Estudios sobre los patrones de configuraciones meióticas de *O. cordobae* y *O. americanus*, incluyendo poblaciones relevadas en el presente estudio, muestran una marcada variación intraespecífica en la especie tetraploide (Salas y Martino, 2008). Esta diversidad en los patrones de configuraciones meióticas, también fue observada por Beçak *et al.* (1967) para *O. americanus* en tres localidades del Estado de San Pablo en Brasil. Los resultados obtenidos por Salas y Martino (2008) muestran que la configuración que se encuentra con mayor frecuencia y siempre presente en todas las localidades analizadas corresponde a la 11 IV (11 grupos tetravalentes). Mientras que en la localidad de El Cano la figura meiótica más frecuente corresponde a la 6 IV (6 grupos tetravalentes) 10 II (10 grupos bivalentes). En la localidad de El Cano, donde las poblaciones se encuentran en contacto con las poblaciones diploides, fue reportada la mayor diversidad, observándose nueve variantes de configuraciones meióticas. Así, la diversidad de figuras meióticas observadas, es elevada en las áreas en donde las poblaciones de *Odontophrynus* diploides y tetraploides coexisten en sintopía, mientras que las poblaciones alejadas entre sí, presentan una diversidad baja de configuraciones meióticas. De acuerdo a los resultados obtenidos, Salas y Martino (2008), concluyen que el mayor número de bivalentes encontrados en los individuos de *O. americanus* de la zona de sintopía podría estar relacionado con un origen más antiguo de esta población sintópica en comparación con las demás poblaciones analizadas.

Posibles eventos de diploidización en *Odontophrynus* han sido discutidos por varios autores (Ruiz, 1980; Ruiz *et al.*, 1981; Schmid *et al.*, 1985; Beçak y Beçak, 1998; Beçak y Kobashi, 2004). También se ha encontrado que las especies diploide, *Hyla chrysoscelis*, y tetraploide, *Hyla versicolor*, tienen una regulación genética similar a la descrita para las especies diploide y tetraploide de *Odontophrynus*, con la pérdida de DNA no esencial ocurriendo en la entidad tetraploide (Bachmann y Bogart, 1975). La reducción de tamaño de los cromosomas en los poliploides ha sido sugerida como un mecanismo de adaptación correctiva liberando el exceso de material genético

representado por la duplicación de los genes y las secuencias repetitivas de ADN (Marchi *et al.*, 1983). Este hecho podría explicar el menor tamaño relativo observado en los cromosomas de *O. americanus* en relación a su contraparte diploide.

La abundancia de multivalentes en la meiosis, que ha sido usada como el principal argumento a favor de la autoploidía (Beçak *et al.*, 1966; Tymowska, 1991; Otto y Whitton, 2000; Kondo y Kashiwagi, 2004), podría no necesariamente reflejar la absoluta homología de los genomas involucrados, sino que puede indicar que los genomas están cercanamente relacionados con bajos niveles de divergencia genética y que ellos han retenido la capacidad de aparearse (King, 1990; Ptacek *et al.*, 1994; Rosset *et al.*, 2006).

Estudios previos han demostrado que las poblaciones tetraploides presentan una variabilidad inter e intrapoblacional en la localización y número de constricciones secundarias (Barrio y Pistol de Rubel, 1972; Beçak y Beçak, 1974; Rosset *et al.*, 2006), regiones organizadoras nucleolares y patrones de heterocromatina constitutiva (Ruiz y Beçak, 1976; Ruiz *et al.*, 1981; Schmid *et al.*, 1985; de Almeida *et al.*, 1986), y número cromosómico (Sáez y Brum-Zorrilla, 1966; Beçak y Beçak, 1998). Esta variabilidad cariológica ha sido tradicionalmente interpretado como una consecuencia de los rearreglos y posterior diploidización del genoma tetraploide ancestral (Ruiz, 1980; Ruiz *et al.*, 1981; Schmid *et al.*, 1985; Beçak y Beçak, 1998). Sin embargo, King (1990) consideró que la variabilidad citogenética mencionada podría reflejar diferencias presentes en la especie diploide parental. Así, las poblaciones tetraploides podrían haber surgido independientemente, en ocasiones separadas por hibridización de citotipos diploides diferentes. Rosset *et al.* (2006) encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los tetravalentes entre poblaciones de *O. americanus* del noroeste y el sur de Argentina. Estas diferencias indicarían orígenes múltiples independientes de la poblaciones tetraploides (Rosset *et al.*, 2006).

5.3. Morfometría

Odontophrynus americanus y *O. cordobae* representan un par de especies crípticas debido a que son indistinguibles morfológicamente. Los primeros estudios morfológicos realizados en el género *Odontophrynus* no mostraron diferencias significativas (Gallardo, 1966; Beçak *et al.*, 1966, 1970; Barrio y Pistol de Rubel, 1972; Cei, 1980), incluso tampoco entre el denominado hasta ese momento *O. americanus* diploide y el posteriormente descrito como *O. lavillai* (Cei, 1985). Sin embargo Martino y Sinsch (2002) utilizaron mediciones morfométricas como uno de los grupos de caracteres independientes que permitió diferenciar poblaciones diplo/tetraploides de *Odontophrynus*, definiendo así la nueva entidad *O. cordobae*.

En la mayoría de las especies de animales dioicos, los machos y las hembras difieren en el tamaño corporal, pero la extensión y la dirección de esta diferencia varía ampliamente dentro y entre especies (Arak, 1988). En la mayoría de las especies animales las hembras son más grandes que los machos (Ghiselin, 1974). El dimorfismo sexual morfológico es reportado en numerosas especies de anuros en las cuales las hembras (ej.: Bosch y Márquez, 1996b) o los machos (ej.: Taborsky *et al.*, 2009) presentan un mayor tamaño corporal. Martino y Sinsch (2002), no encontraron diferencias estadísticas entre sexos en *O. cordobae* ni en *O. americanus*, aunque observaron valores morfométricos más altos en las hembras de las dos especies. Estos autores, asumen que esta tendencia observada en los individuos utilizados en su trabajo podría ser efecto del sesgo de la muestra.

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en seis variables morfométricas entre sexos para *O. cordobae* y tres variables para *O. americanus*, resultando mayores los valores de las hembras con respecto al de los machos. La mayoría de las variables que no mostraron diferencias significativas, entre ellas el Largo hocico-cloaca, también presentaron valores promedio más altos en las hembras de las dos especies. En términos generales, un mayor tamaño por parte de los machos sería esperado si existiera una competencia activa (selección intrasexual) entre machos con encuentros agresivos (Shine, 1979, Woolbright, 1983, Duellman y Trueb 1986). En todos los sitios relevados para ambas especies en este estudio no fueron observados

encuentros agresivos o competencia física entre machos. Por otra parte, un mayor tamaño de las hembras confiere una ventaja reproductiva en muchos anuros debido a una relación positiva entre el volumen de huevos y el tamaño corporal (Crump, 1974).

En el análisis univariado llevado a cabo solamente con los machos de *O. cordobae* y *O. americanus* se encontraron diferencias significativas en las variables morfométricas, relacionadas con la morfología de la cabeza. En estas variables, *O. americanus* mostró los mayores valores, lo cual podría indicar no solo un mayor tamaño de la cabeza sino también una morfología más alargada en un plano longitudinal. Sin embargo no fueron observadas diferencias significativas en el SVL como lo obtenido por Martino y Sinsch (2002), aunque el valor promedio en esta variable fue levemente mayor en la especie diploide tal como reportaron estos autores. En este sentido, aunque algunos efectos en el tamaño total han sido observados, se describe que muchos poliploides se encuentran dentro del rango de variación morfológica de sus ancestros diploides (Otto y Whitton, 2000). En vertebrados, la poliploidía tiende a tener poco o ningún efecto en el tamaño corporal (Fankhauser, 1945; Mahony y Robinson, 1980). Este hecho puede deberse a que, al contrario de lo que ocurre en plantas, en animales poliploides el aumento en el tamaño celular debido al incremento del contenido de DNA suele acompañarse por una disminución en el número total de células manteniendo un tamaño corporal similar al de los progenitores diploides (Fankhauser, 1945; Bogart, 1980; Mable, 2004).

Sinsch *et al.* (1995), enfatiza la necesidad del uso del análisis multivariado para resolver grupos con similar forma y tamaño. Martino y Sinsch (2002), usando análisis multivariado reportaron una reclasificación correcta del 75% de los individuos de *O. cordobae* (n total=24; pertenecientes a las localidades de Villa Gral. Belgrano y Santa Rosa de Calamuchita) y del 81.2% para individuos de *O. americanus* (n total=33; pertenecientes a las localidades de Río Cuarto y Barreto). Estos autores utilizaron además ejemplares de *O. occidentalis* en el análisis. En el presente estudio, considerando solamente individuos de *O. cordobae* y *O. americanus* pertenecientes a 21 sitios de muestreo, se obtuvo una clasificación positiva del 78.5 % en la especie diploide (n total=79) y del 74.8% en la especie tetraploide (n total=103). En este sentido, Martino y Sinsch (2002), consideran que una clasificación inequívoca de los

individuos de *O. cordobae* y *O. americanus* no es posible y señalan que la distinción morfológica mejora si la edad del individuo es tomada en cuenta, debido a que los diploides tienden a ser más grandes, en promedio, que los tetraploides de la misma edad.

Diferencias en la morfología de los individuos son reportadas también en el complejo diplo/poliploide *Bufo viridis* (Castellano *et al.*, 1998; Castellano *et al.*, 2000). Las diferencias encontradas entre las entidades diploides y tetraploides fueron asociadas por los autores a la diferenciación de hábitats evidenciada por las poblaciones de una y otra ploidía. Sobre la base de la distribución de diploides (zonas bajas con escasas precipitaciones y rangos de temperatura extremos) y tetraploides (zonas montañosas con abundantes precipitaciones y rangos de temperatura menos extremos) de *B. viridis*, Castellano *et al.*, (1998), sugieren que el mayor tamaño corporal y las patas proporcionalmente más cortas de los diploides respecto a los tetraploides podrían ser el resultado de presiones selectivas que favorecen una reducción de los riesgos de desecación.

En el caso particular de las poblaciones de *O. cordobae* y *O. americanus* consideradas en el presente trabajo, sus distribuciones no muestran una marcada amplitud y diferenciación de hábitats ni variaciones climáticas significativas. Además, del porcentaje de individuos clasificados incorrectamente, especialmente de *O. americanus*, el 50% correspondió a ejemplares pertenecientes a zonas de sintopía. Esta diferencia entre individuos tetraploides sintópicos y alopátricos se corresponde con lo obtenido en el análisis univariado.

De acuerdo a la teoría de desplazamientos de caracteres (Brown y Wilson, 1956), se esperaría una acentuación de las diferencias morfológicas entre poblaciones simpátricas de especies cercanamente relacionadas, debido a una presión selectiva, en relación a las diferencias encontradas entre poblaciones alopátricas. En el análisis discriminante, considerando grupos sintópicos y alopátricos de cada especie, se obtuvieron porcentajes mayores de clasificación correcta en individuos alopátricos que en individuos sintópicos en ambas especies. Gráficamente se puede observar la diferenciación entre individuos alopátricos de cada una de las especies, y de individuos sintópicos y alopátricos dentro de cada especie. Contrariamente, esta diferenciación no

es evidente entre ejemplares sintópicos de *O. cordobae* y *O. americanus*. Esta situación se refleja también en el análisis univariado, en donde un mayor número de variables mostraron diferencias significativas en individuos alopátricos.

Debido a que las diferencias observadas en simpatria entre caracteres morfométricos de diploides y tetraploides no son mayores a las observadas en alopatría, los resultados obtenidos se alejan de los resultados esperados bajo la hipótesis del desplazamiento de caracteres. Adicionalmente, la ausencia de evidencias de combate activo entre machos, reforzado por el menor tamaño de estos en relación a las hembras en ambas especies podría sugerir que los caracteres morfológicos externos no tendrían una influencia importante en el reconocimiento y elección de machos coespecíficos por parte de las hembras.

Sin embargo, el comportamiento satélite, en el cual un macho no vocalizador se ubica cerca de un coespecífico vocalizador e intenta amplexar a la hembra atraída al sitio de canto, es una táctica común en estas especies (Zavala Gallo, 2007; Grenat *et al.*, en revisión) y en numerosos anuros (Leary *et al.*, 2005). En este sentido, dada la similitud morfológica entre estas especies, podría esperarse la producción de algunos híbridos en sintopía debido a un apareamiento erróneo de un macho satélite con una hembra heteroespecífica.

Bickford *et al.* (2007) discuten varias razones por las cuales los cambios morfológicos podrían no estar correlacionados con el límite entre especies o bien podrían no ser usados en la discriminación específica. Dos temas parecerían ser generales y recurrentes: las especies crípticas podrían utilizar señales no visuales para la elección de pareja y/o parecerían estar bajo procesos de selección promoviendo la estasis morfológica. Además, las señales visuales son predominantemente reportadas en especies con actividad diurna en sitios con escasa o nula obstrucción visual (Endler, 1992). Las especies *O. cordobae* y *O. americanus* son principalmente crepusculares y nocturnas y frecuentemente se las encuentra en sitios protegidos por la vegetación ripariana. (Grenat *et al.*, en prensa).

Las señales visuales pueden ser transmitidas a una distancia relativamente corta y muchas veces son entorpecidas, o bien oscurecidas, por los diferentes obstáculos presentes en el ambiente. Estos problemas imponen limitaciones de distancia e

iluminación sobre este proceso de comunicación (Harper, 1991). Otro tipo de señales pueden ser más adecuadas para especies que requieren el envío de mensajes a gran distancia, que habitan en ambientes con poca luz, o bien que se encuentran activos en momentos del día en los cuales la iluminación es escasa o nula. En este sentido, a menudo las especies crípticas pueden discriminarse por feromonas o cantos nupciales, y la maquinaria morfológica necesaria para la producción de señales acústicas u olfatorias, no necesariamente difieren de forma apreciable.

5.4. Bioacústica

5.4.1. Canto de advertencia (*advertisement call*)

Los cantos de advertencia en el género *Odontophrynus* se componen de un único o a una serie de trenes de pulsos. Considerando las especies que habitan en Argentina, el grupo *occidentalis* (*O. achalensis*, *O. barrioi* y *O. occidentalis*) presenta un canto conformado por una rápida sucesión de trenes de pulso de longitud variable, usualmente con unos pocos segundos de duración. Cada tren de pulsos presenta entre seis y diez pulsos, con una duración de 70 a 150 ms, y se encuentran separados por intervalos cortos de aproximadamente 30 a 80 ms (Barrio, 1964; Salas y di Tada, 1994; Martino y Sinsch, 2002; Rosset *et al.*, 2007). Por otra parte, los cantos emitidos por las especies pertenecientes al grupo *americanus* (*O. americanus*, *O. lavillai*, *O. cordobae* y *O. maisuma*) consisten de un único tren de pulsos relativamente largo que consta de 30 a 60 pulsos aproximadamente. La duración de estos cantos simples es de 300 a 800 ms, los cuales son emitidos irregularmente a intervalos de extensión variable (Barrio y Pistol de Rubel, 1972; Bogart y Wasserman, 1972; Straneck *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 1998; Martino y Sinsch, 2002; Borteiro *et al.*, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, las vocalizaciones de las especies *O. cordobae* y *O. americanus* presentaron una estructura similar, caracterizada por ser un canto simple monofásico (Littlejohn, 2001) formado por un único tren o grupo de pulsos coincidiendo con lo reportado por otros autores (Bogart y Wasserman, 1972; Barrio y Pistol de Rubel, 1972; Martino y Sinsch, 2002). Conforme a lo discutido por Littlejohn (2001) y a lo observado en los oscilogramas obtenidos en el presente estudio, la mayoría de los cantos de ambas especies presentan una forma similar a un “huso”. En este tipo de canto la intensidad de los pulsos que se encuentran al inicio es baja, se incrementa en los pulsos de la zona central del canto y decae nuevamente en los pulsos que se encuentran al final de la emisión acústica. Los pulsos presentan una estructura similar a la del canto, separados unos de otros por intervalos de silencio cortos.

La duración total del canto fue mayor en *O. americanus* que en *O. cordobae*, al igual que la duración de los pulsos e interpulsos. En estas últimas variables, la duración del interpulso fue mayor que la duración de los pulsos en ambas especies. La menor extensión del bloque pulso-impulso hace que en promedio *O. cordobae* presente un mayor número de pulsos por canto a pesar de presentar una menor duración total del canto. Los valores promedio de cada parámetro obtenidos en este trabajo son similares a los encontrados por Martino y Sinsch (2002), excepto en la duración del interpulso donde para ambas especies estos autores obtuvieron valores más altos.

Una consecuencia casi inevitable de la ectotermia, es la covariación de la temperatura ambiental y la temperatura de los sistemas de producción y recepción acústica (Narins, 2001). Así, los animales ectotérmicos como los anuros, que se comunican mediante estímulos acústicos, se enfrentan a un desafío adicional debido a que la temperatura de su cuerpo influye directamente sobre la tasa de reacción fisiológica que impulsa los músculos involucrados en la producción del sonido (Prestwich, 1994; Navas y Bevier, 2001). Cambios en el ambiente termal del individuo vocalizador pueden generar cambios conspicuos temperatura-dependiente en la estructura del canto (Wong *et al.*, 2004). En este sentido, numerosos estudios demuestran que diferentes aspectos de la producción de señales acústicas son temperatura-dependientes (Blair, 1958; Zweifel, 1968; Sullivan y Malmos, 1994; Navas, 1996; Giacoma *et al.*, 1997; Navas y Bevier, 2001).

En las especies *O. cordobae* y *O. americanus*, los parámetros duración del canto, duración del interpulso, tasa de pulsos y cociente de pulsos mostraron una dependencia significativa con respecto a la temperatura. Es conocido en muchas especies de anuros, que la duración del canto puede ser influenciada por la temperatura ambiental (Zweifel, 1968; Nevo y Schneider, 1976; Sullivan y Wagner, 1988; Howard y Young, 1998; Giacoma y Castellano, 2001). Por otra parte, la temperatura limita las propiedades contráctiles de los músculos del tronco y la laringe involucrados en la producción del canto (Martin, 1972; Wells y Taigen, 1992) y puede explicar la relación positiva encontrada entre la variable tasa de pulsos (y los parámetros que la componen) y la temperatura.

Aunque el canto de advertencia es a menudo considerado como una única unidad

de información, los cantos no necesariamente evolucionan de manera unitaria. Las diferentes propiedades acústicas de los cantos se encuentran bajo diferentes restricciones y presiones selectivas, y podrían evolucionar a ritmos diferentes (Cocroft y Ryan, 1995). Las propiedades del canto varían dentro de los individuos a lo largo de un amplio continuo (Ryan y Wilczynski, 1991; Giacoma *et al.*, 1997) que fue categorizado por Gerhardt (1991), utilizando coeficientes de variación, en propiedades estáticas (bajo restricciones morfológicas o morfo-fisiológicas) y dinámicas (bajo restricciones energéticas). De acuerdo a lo que han postulado varios autores, los rasgos estáticos evolucionarían bajo selección estabilizadora o direccional débil, debido a que juegan un papel importante en el reconocimiento de las especies, mientras que los rasgos dinámicos pueden haber evolucionado bajo los efectos de una fuerte selección direccional, debido a su mayor potencial para transmitir información sobre la condición de los machos y, por tanto, podrían desempeñar un papel en la elección de pareja (Gerhardt, 1991; Gerhardt y Huber, 2002). En este sentido, a partir de la teoría de la información se conoce que mientras más fuertes sean las restricciones sobre una propiedad de una señal, mayor será la redundancia de la información que puede ser transmitida y más bajo el riesgo de transmisión de errores (Nauta, 1972). Si esta regla general resulta cierta también en los sistemas biológicos, las propiedades acústicas con mayores restricciones deberían ser las más adecuadas para transmitir aquellos mensajes cuya interpretación errónea tiene un alto costo en la aptitud, tanto para los que envían la señal como para los receptores.

La transmisión eficiente de señales acústicas es fundamental para la reproducción en animales que dependen del canto de advertencia para el reconocimiento de la pareja y esta premisa resulta cierta para la mayoría de las especies de anuros (Gerhardt, 1994). Además, debido a que el costo energético del canto en muchas especies es demasiado alto, la selección debería favorecer mecanismos para incrementar la eficiencia de la producción y la transmisión del sonido, permitiendo al macho vocalizador conservar las reservas de energía maximizando la transmisión de las señales hacia el receptor, especialmente hacia las hembras (Wells y Schwartz, 2007).

El aislamiento pre-reproductivo en pares de especies de anuros diplo/poliploides depende principalmente de diferencias en la estructura del canto de advertencia.

Ejemplos bien estudiados son *Hyla chrysoscelis/H. versicolor*, el complejo *Bufo viridis* y diez especies del género *Neobatrachus* (Lörcher y Schneider, 1973; Ralin, 1977; Roberts, 1997; Stöck, 1998). Análisis realizados por Castellano y Giacoma (1998) a niveles individual y poblacional de la variabilidad de las propiedades del canto de *Bufo viridis*, sugieren que parámetros estáticos tales como la frecuencia y la tasa de pulsos presentan la variabilidad más baja a estos niveles. Como la fuerza de la selección fenotípica sobre un carácter parece depender particularmente del patrón de variabilidad de dicho rasgo, la tasa de pulsos y la frecuencia del canto deberían tener, potencialmente, una mayor tasa de evolución. Así, una rápida divergencia en estos caracteres podría resultar en una rápida evolución de barreras de apareamiento precigóticas (Coyne y Orr, 1989).

En numerosos complejos que incluyen especies poliploides fueron observadas variaciones en la duración del bloque pulso/interpulso, las cuales generan diferencias en la tasa de pulsos entre especies o citotipos relacionados (Ej.: *Hyla chrysoscelis/H. versicolor*- Ralin, 1977; *Neobatrachus*- Roberts, 1997; Complejo *Bufo viridis*-Lörcher y Schneider, 1973; Stöck, 1998; *Pleurodema kriegi/P. cordobae*-Valetti *et al.*, 2009). En el presente estudio se encontraron resultados acordes a los reportados en individuos diploides y tetraploides de *Odontophrynus* por Bogart y Wasserman (1972) y Martino y Sinsch (2002), en donde los individuos diploides difieren de los tetraploides por producir una mayor tasa de pulsos. De acuerdo a estos autores y a lo observado en el presente trabajo, este hecho se debe principalmente a que los cantos de los individuos diploides presentan pulsos e interpulsos más cortos, además de un mayor número de pulsos por canto.

Una tasa de pulsos mayor en aquellos citotipos de menor ploidía es una característica que ha sido observada en otros complejos similares (Stöck, 1998 en el complejo *Bufo viridis*; Holloway *et al.*, 2006 en *Hyla chrysoscelis/H. versicolor*), aunque en el caso particular del par de especies poliploides *Pleurodema kriegi* ($2n=44$)/*P. cordobae* ($2n=88$), es la especie octoploide la que presenta valores más altos en esta variable. En el análisis entre poblaciones realizado en el presente estudio, la tasa de pulsos fue el parámetro que mostró mayor variabilidad a este nivel. Estos resultados son acordes a los encontrados en otras especies (Gerhardt, 1991; Giacoma y Castellano,

1998).

Los análisis dentro de cada especie no mostraron relaciones entre las distancias geográficas y las distancias acústicas, pero sí fueron encontradas asociaciones moderadas de algunas variables con respecto a la latitud. La duración del interpulso y la tasa de pulsos fueron las únicas variables que mostraron una variación clinal en ambas especies, aun cuando las poblaciones sintópicas fueron excluidas del análisis, aunque en este caso su asociación con la latitud fue más leve. De acuerdo a lo observado ambas especies muestran una menor duración del intervalo entre pulsos en simpatria, causando un aumento en su tasa de pulsos. En ambas especies, la duración del interpulso aumenta a medida que se avanza hacia las poblaciones alopátricas, con la consiguiente disminución en la tasa de pulsos. De acuerdo a Giacoma y Castellano (1998) esta variabilidad podría ser atribuida a adaptaciones locales, diferencias en la disponibilidad de recursos o a la reducción en el flujo de genes.

La producción de la tasa de pulsos involucraría una serie de contracciones activas de los músculos laríngicos dilatadores, los cuales están bien adaptados a generar rápidos movimientos con la periodicidad de la tasa de pulsos (Martin y Gans, 1972). Así, el tamaño del músculo laríngeo influye en los parámetros temporales afectando la fuerza de las contracciones (Giacoma y Castellano, 2001). Por esta razón, la tasa de pulsos, considerada una variable temporal estática del canto, se encontraría bajo restricciones morfo-fisiológicas. La heredabilidad de los rasgos morfológicos es generalmente mayor a la de los rasgos comportamentales. Si la expresión de un rasgo etológico es estrictamente dependiente de un carácter morfológico, la heredabilidad del rasgo comportamental bajo restricciones morfológicas (frecuencia dominante) o morfo-fisiológicas (tasa de pulsos), tienen mayor heredabilidad que aquellos parámetros bajo limitaciones energéticas, tales como la duración del canto (Giacoma y Castellano, 2001).

Por otra parte, no fueron encontradas diferencias intra e interespecíficas en la variable espectral Frecuencia Dominante. Este resultado es reportado también en otros complejos diplo/poliploides. En el complejo diplo/tetraploide *Hyla chrysoscelis/H. versicolor* varios autores han reportado la ausencia de diferencias en los caracteres espectrales entre los cantos de este par de especies (Blair, 1958; Gerhardt, 1974, 1996;

Gerhardt *et al.*, 1994).

Se conoce que algunos parámetros acústicos, tal como la frecuencia dominante, pueden variar predeciblemente con el tamaño corporal (SVL) de los machos vocalizadores (Cocroft y Ryan, 1995). En muchos anuros, el tamaño del cuerpo tiene una fuerte correlación negativa con la frecuencia (Ryan, 1988; Castellano *et al.*, 1999). Considerando los resultados obtenidos a partir de los análisis morfométricos realizados sobre los individuos de *O. cordobae* y *O. americanus*, en donde no se encontraron diferencias significativas en el tamaño corporal (SVL), resultaría coherente que la frecuencia dominante no difiera entre estas especies. Los valores promedio de frecuencia dominante obtenidos por Martino y Sinsch (2002) para las especies en estudio fueron levemente mayores a los encontrados en el presente trabajo pero no mostraron diferencias interespecíficas. La frecuencia dominante no evidenció una variación clinal a lo largo de la distribución analizada para ninguna de las especies, siendo coherente este resultado con la ausencia de asociación encontrada entre el tamaño corporal y la latitud.

Además de las diferencias obtenidas en la tasa de pulsos entre *O. cordobae* y *O. americanus*, se observaron diferencias significativas en las restantes variables temporales. Entre ellas, la duración del canto es considerada un parámetro dinámico (Gerhardt, 1991; Castellano *et al.*, 1998, 2000;). A niveles inter-poblacionales los factores ecológicos a corto plazo, tales como diferencias locales en la disponibilidad de alimentos, pueden causar diferencias aleatorias en posibles inversiones energéticas, las cuales podrían afectar las propiedades dinámicas del canto (tales como la duración del canto) más que las diferencias genéticas (Giacoma y Castellano, 2001). La duración del canto está influenciada por las temperaturas ambientales, así como también por el gasto de energía. Ambos factores tenderán a aumentar la variación en este parámetro (Giacoma y Castellano, 2001).

5.4.2. Canto de liberación (*release call*)

El canto de liberación de las especies *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* presentan una estructura similar entre ellos y con sus respectivos cantos de advertencia. Esto coincide con lo observado por Barrio (1964) para la especie tetraploide. El trabajo citado anteriormente constituye el único estudio donde se muestran aspectos relacionados al canto de liberación en *Odontophrynus*. Sin embargo, este autor solamente muestra un sonograma del canto de liberación de *O. americanus* pero no realiza mediciones de los diferentes parámetros acústicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos algunas características del canto de liberación de *O. cordobae* y *O. americanus*, en comparación con sus respectivos cantos de advertencia, son interesantes de mencionar. En primer lugar, la duración de los cantos de liberación de cada una de las especies fue aproximadamente la mitad de la de sus respectivos cantos de advertencia. Esta relación se mantuvo para el parámetro pulsos/canto en *O. cordobae*. En *O. americanus* el promedio pulsos/canto fue menor a la presentada por su canto de advertencia, pero con una relación mayor que la observada en la especie diploide. Así, el número de pulsos por canto fue similar entre ambas especies, no encontrándose diferencias significativas entre los promedios de *O. cordobae* y *O. americanus* para este parámetro.

Odontophrynus cordobae mostró valores promedio mayores en la tasa y el cociente de pulsos en relación a los obtenidos para el canto de advertencia. Esto se debe principalmente a una disminución en la duración del intervalo entre pulsos. La especie *O. americanus* mostró una duración del pulso con valores notablemente más bajos en el canto de liberación, similares a los valores observados en la especie diploide. Esta disminución en los valores de la duración de pulsos trae asociada modificaciones importantes en los valores de la tasa de pulsos (mayores a los obtenidos en el canto de advertencia) y del cociente de pulsos (menores a los observados en el canto de advertencia).

En anuros, los cantos de advertencia (*advertisement call*) y de liberación (*release call*) difieren en su función y están potencialmente sujetos a fuerzas opuestas en escenarios de simpatria entre especies relacionadas (Leary, 2001). Mientras que el canto

de advertencia sirve para atraer a hembras coespecíficas, actuando a menudo como un mecanismo de aislamiento reproductivo, el canto de liberación tiene como función la de evitar amplexos prolongados entre machos co- o heteroespecíficos. En este último caso, una señal efectiva podría traducirse en ventajas mediante la conservación de energía, evitando el derroche de gametas, reduciendo la exposición a predadores, y proporcionando más tiempo para las oportunidades de reproducción (Blair, 1968). Tomando en cuenta su función, sería esperado que en zonas de sintopía los caracteres del canto de especies relacionadas estuvieran influenciados por selección divergente, mientras que los caracteres del canto de liberación deberían estar bajo la influencia de la selección convergente (Rand, 1988).

Si bien el número de individuos y poblaciones consideradas en este análisis es limitado, los resultados obtenidos a partir del análisis discriminante muestran que los cantos de liberación difieren entre especies tanto en alopatria como en simpatria, aunque los parámetros involucrados en esta distinción son diferentes. En alopatria la diferenciación estuvo asociada al cociente de pulsos, mientras que en simpatria la distinción entre especies estuvo relacionada con la duración de pulsos. Si bien los individuos sintópicos mostraron cantos de liberación diferentes es interesante notar que *O. americanus* muestran valores de duración de pulsos y número de pulsos por canto similares a los de *O. cordobae*. En consecuencia, la diferencia en el cociente de pulsos entre las dos especies en sintopía es notablemente mayor a la encontrada entre sus respectivos cantos de advertencia.

Contrariamente a lo esperado, bajo una hipótesis de desplazamiento de caracteres en el canto de liberación (selección convergente), las distancias acústicas calculadas muestran una mayor diferenciación entre especies en sintopía que en alopatria. Un resultado similar fue observado en los cantos de advertencia, evidenciándose una mayor diferenciación en sintopía que en alopatria. Se conoce que la poliploidización puede traer asociada cambios en algunas propiedades del canto de advertencia, tales como la tasa de pulsos (Keller y Gerhardt 2001), como un resultado directo del aumento en el tamaño celular (Bogart y Wasserman, 1972). Bajo la misma base, un evento de poliploidización podría afectar las propiedades del canto de liberación. Este hecho podría explicar las diferencias observadas entre especies en ambos tipos de

vocalización, pudiendo afectar directamente la función del canto de liberación.

5.5. Sobre las posibles causas de la variación acústica en poblaciones de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus*

Los estudios sobre variación geográfica intraespecífica tienen dos objetivos principales: la descripción de los patrones espaciales de variación, y el análisis de las fuerzas responsables de estos patrones (Cracraft, 1989). Estos estudios se pueden abordar de dos maneras diferentes, desde un enfoque “taxonómico” o desde un enfoque “comparativo”. Mediante el enfoque “taxonómico”, los investigadores centran la atención en los taxones, intentando inferir su evolución a través del análisis de los agentes causales de los patrones geográficos. En la aproximación “comparativa” el enfoque está centrado en los caracteres, y se emplea a los taxones como modelos para entender la evolución de estos rasgos (Castellano *et al.*, 2000).

En las últimas décadas los estudios geográficos con un enfoque “comparativo” han sido preferentemente utilizados para estudiar la evolución del comportamiento, y en particular la evolución de aquellos rasgos comportamentales para la elección de pareja (Foster y Cameron, 1996; Endler y Foster, 1998). Algunos autores han sugerido que estas señales, debido a la información especie-específica que contienen, deberían mostrar poca variación dentro de las especies (Paterson, 1985). Sin embargo, numerosos estudios de variación geográfica han refutado esta perspectiva y han mostrado diferencias significativas entre poblaciones de una misma especie a lo largo de su distribución (ej.: Bernal *et al.*, 2005; Bionda *et al.*, 2006; Baraquet *et al.*, 2007). La mayoría de estos estudios analiza la variación geográfica de las señales relacionadas con la elección de pareja, con el fin de comprender el rol del aislamiento geográfico (Herring y Verrel, 1996), el refuerzo (Butlin, 1987; Gerhardt, 1994b) o la selección sexual (West-Eberhard, 1983) en las etapas más tempranas de la divergencia de las poblaciones que podrían resultar en especiación (Otte y Endler, 1989; Castellano *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se han encontrado diferencias intraespecíficas en diferentes parámetros del canto de advertencia en las especies *O. cordobae* y *O. americanus*, principalmente cuando se analizaron las diferencias entre poblaciones sintópicas y alopátricas. Cuando se analiza la variabilidad geográfica de las señales relacionadas a la

elección de pareja, pueden surgir varias preguntas sobre las fuerzas responsables de su evolución. Podemos preguntarnos si estas fuerzas producen los mismos patrones de divergencia poblacional sobre diferentes caracteres relacionados con el reconocimiento de parejas, o bien, si los diferentes patrones se deben a diferencias en la función del carácter (por ejemplo, reconocimiento de especies en comparación con reconocimiento de la calidad de una determinada pareja); o bien, si los diferentes patrones reflejan diferentes tipos de restricciones evolutivas actuando sobre los caracteres (indicadores de condición de la viabilidad de los animales, o que poseen un alto componente de varianza genética aditiva) (Castellano *et al.*, 2000).

Uno de los posibles agentes causales de la variación intraespecífica observada es la selección natural, pudiendo asumir la forma de selección divergente por variabilidad ambiental o selección en contra del apareamiento heteroespecífico.

La selección ambiental tiende a mejorar la transmisión acústica (Castellano *et al.*, 2000). Dado que la eficiencia de la transmisión de los sonidos depende tanto de sus propiedades acústicas, como de la vegetación y el microclima del medio ambiente (revisión en Gerhardt, 1983; Ryan, 1988), entornos diferentes pueden producir diferentes presiones selectivas y causar divergencia entre poblaciones (Ryan y Wilczynski, 1991). A partir de los muestreos realizados en la presente investigación no se observaron diferencias notables en los tipos de hábitat utilizados como sitios de reproducción ni tampoco en los microhábitats utilizados como sitios individuales de canto, a lo largo de la distribución abarcada para las especies en estudio. La principal diferencia se encontró en la especie *O. cordobae* en alopatria, donde algunas poblaciones fueron relevadas en arroyos serranos, mientras que otras fueron encontradas reproduciéndose en lagunas de tamaño variable semipermanentes o temporales. En simpatria todas las poblaciones de esta especie utilizaron como sitio de reproducción diferentes tipos de lagunas. Sin embargo las características generales de los sitios individuales de canto fueron similares en todos los casos.

Considerando a la temperatura como un factor ambiental afectando las propiedades del canto, tampoco se observaron diferencias relacionadas a las temperaturas a la cual vocalizaron los individuos de las distintas poblaciones en *O. cordobae* y *O. americanus*. Los rangos de temperaturas registradas en ambas especies

estuvieron ampliamente solapados, y los rangos de temperatura a las cuales fueron grabados los individuos sintópicos están incluidos dentro del rango de sus respectivas especies.

Algo diferente es la selección sexual contra el apareamiento heteroespecífico. Es conocido que en anfibios anuros las diferencias en ploidía se encuentran generalmente asociadas con diferencias en la distribución geográfica y en el canto de advertencia, lo cual explicaría el aislamiento reproductivo entre taxones (Petit *et al.*, 1999). Debido a que el canto de advertencia es una herramienta poderosa para distinguir entre especies, se espera entonces, que las diferencias acústicas sean más marcadas entre poblaciones de especies con diferentes niveles de ploidía que coexisten en simpatria y menos diferentes entre esas especies en alopatria (Arnetz y Bauer, 1996). En este sentido, la teoría del desplazamiento de caracteres reproductivos predice la acentuación de diferencias en el comportamiento pre-reproductivos en una zona de simpatria entre dos especies de origen común (Dobzhansky, 1951; Brown y Wilson, 1956).

El desplazamiento de caracteres divergente de comportamientos de cortejo del macho que sirven como mecanismos de aislamiento pre-reproductivos ha sido documentado en una amplia variedad de organismos (Grant, 1972; Waage, 1979; Howard, 1993; Hostert, 1997), involucrando en su mayoría vocalizaciones de advertencia de anuros (Gerhardt, 1994b). Si el desplazamiento reproductivo ocurre, las diferencias observadas en la preferencia de las hembras y las características de los machos en una zona de contacto llevarán a una gran divergencia de los cantos de los machos y de la preferencia del óptimo por parte de la hembra (Márquez y Bosch, 1997).

El análisis de agrupamiento, considerando todas las poblaciones estudiadas, muestra una notable divergencia de las poblaciones sintópicas de La Escondida y El Cano de las restantes poblaciones diploides y tetraploides respectivamente, aun de aquellas geográficamente cercanas. Este resultado es reforzado por el análisis discriminante y las distancias calculadas que muestran una mayor diferenciación acústica entre las poblaciones sintópicas que entre las poblaciones alopátricas de *O. cordobae* y *O. americanus*. Los resultados obtenidos parecerían ser consistentes con el hecho de que la segregación acústica observada entre poblaciones sintópicas y alopátricas de las dos especies en estudio podría estar explicadas por un desplazamiento

de estas componentes básicas del canto de advertencia de los individuos que habitan en zonas de contacto, en relación a sus coespecíficos que viven en alopatria.

Sin embargo, existen pocos ejemplos bien documentados en donde pueda demostrarse la ocurrencia de eventos de desplazamiento de caracteres y refuerzo, aunque la mayoría de estos incluyen desplazamiento sobre caracteres del canto de advertencia de diferentes especies de anuros (ej.: complejo de *Hyla ewingi* — Littlejohn, 1965; complejo de *Pseudacris nigrita* — Fouquette, 1975; *Gastrophryne carolinensis* y *G. olivacea* — Loftus-Hills y Littlejohn, 1992; *H. chrysoscelis* y *H. versicolor* — Gerhardt, 1994a). Waage (1979) sugiere que la posible rareza del desplazamiento de caracteres podría ser atribuida al hecho de que la mayoría de los estudios se han concentrado sobre las señales de cortejo de los machos más que sobre la selectividad de las hembras. Siempre que las señales de dos especies sean perceptualmente distinguibles en el momento en que la simpatria se logra, no existiría ninguna necesidad lógica de una mayor divergencia en las señales de los machos. Más bien, la selección podría actuar sobre la selectividad de las hembras. Esto sería también esperado debido a que los apareamientos erróneos podrían tener usualmente efectos más severos sobre el éxito reproductivo de las hembras más que en el de los machos (Gerhardt, 1994a).

En este sentido, otro posible agente causal de la variación en las señales asociadas al reconocimiento de parejas podría ser la selección sexual (West-Eberhard, 1983). En este caso, la variación de las señales refleja las diferencias entre poblaciones en las preferencias de pareja, las cuales pueden tener o no algún significado adaptativo (Endler y Houde, 1995; Gerhardt, 1994b).

De acuerdo a la clasificación propuesta por Emlen y Oring (1977) las especies en estudio tendrían un sistema de apareamiento poligínico por dominancia del macho de tipo lek (Zavala Gallo, 2007). Debido a que en este sistema de apareamiento el número de machos disponibles por hembra es bastante elevado, es la hembra quien toma la iniciativa en la selección de pareja, moviéndose hacia el macho vocalizador como sucede en la mayoría de los anuros (Salthe y Mecham, 1974). Las hembras pueden discriminar entre diferentes cantos y elegir a los machos sobre esta base, generando así una selección sexual sobre determinados atributos del canto. Los resultados encontrados

podrían ser explicados mediante un posible cambio en la preferencia de los óptimos por parte de las hembras, en presencia de machos de especies cercanamente relacionadas con el fin de evitar apareamientos erróneos.

Gerhardt (1991) sugiere que en muchas especies el rango típicamente estrecho de la tasa de pulsos dentro de una población es mantenido por la elección de las hembras. Este hecho fue corroborado por Castellano y Giacoma mediante experiencias de playback con hembras del complejo *Bufo viridis*. Si esto estuviera sucediendo en las poblaciones sintópicas en estudio, las hembras de estas especies cercanamente relacionadas podrían estar seleccionando a los machos coespecíficos de acuerdo a la tasa de pulsos de los cantos que los mismos producen. Esta propiedad presentó diferencias entre especies y variación entre individuos de la misma especie. De esta manera, el reconocimiento coespecífico y la preferencia de pareja resultan de la interacción entre la variación de los machos y las preferencias de las hembras. Esta interacción puede causar apareamiento no-aleatorio o selectivo, tanto entre, como dentro de la especie (Ryan, 1990). Para evaluar esta posible causa de variación acústica en las señales de *O. cordobae* y *O. americanus* sintópicos serían necesarios experiencias de playback similares a las utilizadas por Castellano y Giacoma (1998), en las cuales diferentes estímulos acústicos variando distintos parámetros de los cantos co- y heteroespecíficos fueron ofrecidos a hembras de una y otra especie.

Ryan y Rand (1993, 2001) analizaron en base a diferentes experiencias de fonotaxis los posibles patrones que pueden surgir a partir de la elección por parte de la hembra sobre estímulos coespecíficos y heteroespecíficos, utilizando especies cercanamente relacionadas. Estos autores realizaron experiencias para determinar si había reconocimiento de la señal, es decir si existía algún tipo de respuesta hacia la señal emitida, y si las hembras discriminaban entre señales, prefiriendo una señal por sobre la otra. Estos autores sugirieron cuatro patrones de reconocimiento y discriminación de señales que categorizaron desde un menor a un mayor efecto del canto heteroespecífico sobre la elección de la hembra (Fig. 46).

La situación que se asume podría ocurrir más comúnmente, es que las hembras reconozcan solamente la señal emitida por machos coespecíficos (Fig. 46A). El patrón que podría ser considerado como la próxima alternativa más probable es aquel donde las

hembras reconocen ambas señales, co- y heteroespecíficas, como apropiadas pero prefieren la señal emitida por sus coespecíficos (Fig. 46B). Una alternativa menos probable es cuando las hembras, erróneamente, reconocen ambas señales como indicadores de parejas apropiadas y no discriminan entre estas dos señales (Fig. 46C). El escenario menos probable resulta cuando la hembra reconoce ambas señales como apropiadas y prefiere la señal heteroespecífica (Fig. 46D). Si bien los patrones propuestos no agotan todas las posibles interacciones, representan seguramente los casos más probables (Ryan y Rand, 2001).

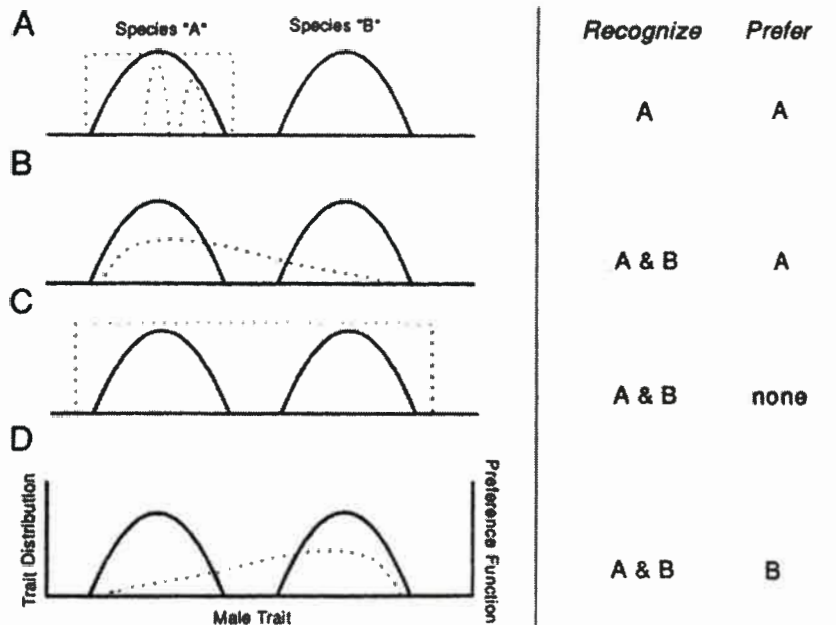


Fig. 46: Posibles patrones de reconocimiento de señales y discriminación por parte de las hembras ante la presencia de estímulos coespecíficos y heteroespecíficos. Las líneas sólidas muestran la distribución de un determinado rasgo del canto de los machos de dos especies cercanamente relacionadas (“A” y “B”), y las líneas punteadas muestran la función de preferencia de las hembras de la especie “A” la cual podría resultar en uno de los cuatro patrones (A-D) propuestos. Tomado de Ryan y Rand (2001).

La ausencia de híbridos entre *O. cordobae* y *O. americanus* en la naturaleza y los cruces artificiales exitosos entre ejemplares diploides y tetraploides del género *Odontophrynus* muestran que el aislamiento reproductivo entre este par de especies crípticas estaría basado en barreras pre-reproductivas y no en una viabilidad reducida de

los híbridos (Beçak *et al.*, 1970; Beçak y Beçak, 1974). De ocurrir alguno de estos esquemas de reconocimiento y elección de señales, el primer patrón parecería ser el más apropiado, considerando el bajo o nulo grado de error en los apareamientos en las zonas de sintopía.

Tres posibles funciones de preferencia podrían resultar en el primer patrón mostrado en la figura 46A: 1) todas las señales coespecíficas podrían ser igualmente atractivas; 2) podría actuar la selección estabilizadora sobre las señales promedio; o 3) podría actuar la selección direccional favoreciendo señales que se apartan del promedio (Ryan y Rand, 2001).

Tomando en cuenta la variable tasa de pulsos de *O. cordobae* y *O. americanus* (Fig. 37) coexistiendo en sintopía, se observa que la distribución de los valores para este parámetro acústico se encuentra desplazada de la media hacia los valores más bajos en *O. americanus* y hacia los valores más altos en *O. cordobae*. Littlejohn (2001) propuso gráficos hipotéticos que muestran los cambios en la variación y distribución de un determinado atributo clave en las señales relacionadas con la atracción de parejas, en dos especies cercanamente relacionadas, previa y posteriormente al establecimiento de la sintopía (Fig. 47).

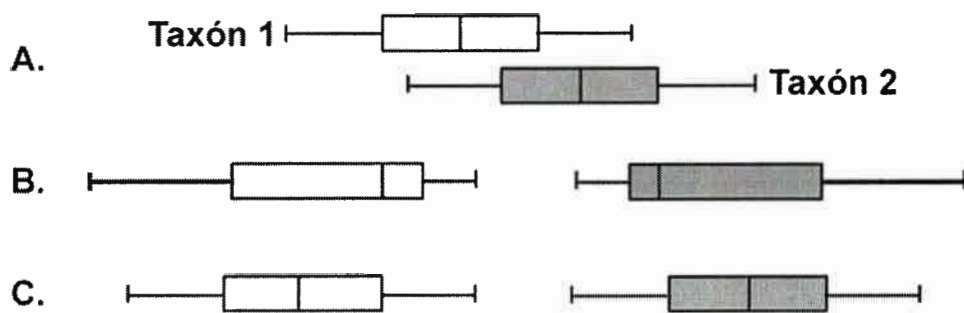


Fig. 47: Gráficos de caja (Box plots) hipotéticos mostrando los cambios que sucederían en la variación y distribución de un atributo clave en las señales asociadas a la atracción de parejas de dos taxones cercanamente relacionados. A) Solapamiento de las distribuciones normales en poblaciones alopátricas antes de producirse el contacto; B) distribución sesgada asociada con el desplazamiento de caracteres reproductivos y el refuerzo durante las interacciones sintópicas iniciales; C) restauración de las distribuciones simétricas durante un equilibrio posterior, en sintopía. Tomado de Littlejohn (2001).

De acuerdo a lo propuesto por este autor, la presencia de distribuciones sesgadas con largas colas sobre el lado contralateral (divergente) y el truncamiento sobre el borde ipsilateral podría ser esperado al actuar la selección por refuerzo en las etapas tempranas del contacto en sintopía. Subsecuentemente, cuando el equilibrio es alcanzado, los procesos normalizadores de la selección sexual prevalecerían, y la distribución de los valores volvería a ser normal, posiblemente leptocúrtica (Littlejohn, 2001).

Sin embargo, las poblaciones simpátricas podrían diferir de las poblaciones alopátricas de su misma especie aun cuando el desplazamiento de caracteres se encuentra ausente. A diferencia del caso hipotético planteado por Littlejohn (2001), las especies *O. cordobae* y *O. americanus* muestran diferencias notables aun en alopatria, con ausencia de solapamiento acústico. Es aceptado que la probabilidad de un establecimiento exitoso de una nueva especie poliploide sería mucho mayor si la duplicación genómica tuviera efectos directos sobre rasgos que son importantes en el reconocimiento y elección de pareja. En este sentido, estudios realizados por Keller y Gerhardt (2001), sugieren que una reducción en la tasa de pulsos podría ser una consecuencia directa del nivel de ploidía, lo cual fue observado en otras especies (complejo de *Bufo viridis* — Stöck, 1998; *Hyla chrysoyelis-H. versicolor* — Holloway *et al.*, 2006). De esta manera, la poliploidización podría conducir a un cambio predecible y consistente en el canto de advertencia, tal vez como resultado directo del aumento de tamaño de las células (Bogart y Wasserman, 1972), más que por el aumento del número de genes (Keller y Gerhardt 2001), lo que daría como resultado el aislamiento automático entre entidades diploides y tetraploides. Este efecto directo sobre el fenotipo pudo haber sido acompañado por cambios correlacionados en la preferencia de las hembras, o bien por selección contra las hembras que no se apareaban con machos de la misma ploidía (Keller y Gerhardt, 2001).

Si el aislamiento reproductivo entre taxones diploides y poliploides estuviera dado por el evento de poliploidización en sí, o bien reforzadas por selección previamente al establecimiento de la simpatria, en zonas de contacto secundarias, se esperaría que las hembras pudieran reconocer y discriminar a sus coespecíficos sin que el desplazamiento de caracteres o el refuerzo hayan ocurrido sobre ningún atributo de las señales de los machos. Así, las diferencias observadas en sintopía en los cantos de las especies en

estudio podrían responder a la preferencia de las hembras de una especie, en presencia de machos heteroespecíficos, por señales con valores de atributos más extremos, dentro del rango de variabilidad de ese carácter. Gráficamente podría asemejarse al primer patrón de preferencia (Fig. 46A) propuesto por Ryan y Rand (2001). O bien, estas diferencias pueden surgir a partir de una respuesta comportamental de los machos, produciendo una variación instantánea en ese atributo del canto ante la presencia de un macho vocalizador heteroespecífico cercano a su sitio de canto (interferencia). Ambas respuestas tienden a minimizar el riesgo de apareamientos erróneos, y por lo tanto a maximizar el éxito reproductivo de los individuos.

Algunos autores han demostrado en varias especies la ocurrencia de esta plasticidad, regulada socialmente, en los cantos de anuros durante las agregaciones reproductivas (Wells y Schwartz, 1984a, b; Ryan, 1985; Lopez *et al.*, 1988; Brenowitz y Rose, 1994; Rose y Brenowitz, 1997). Rose y Brenowitz (1997) proponen que los umbrales óptimos de los distintos atributos del canto pueden variar entre machos dentro de una agregación, y como una función de la densidad de machos vocalizadores; en anuros, la densidad de machos vocalizando puede variar entre sitios reproductivos, entre noches, y hasta dentro de una misma noche de actividad. Además, en zonas de sintopía se agrega un factor no menos importante que es la presencia de heteroespecíficos cercanamente relacionados, con un canto estructuralmente similar.

En este último caso se combinarían dos tipos de respuesta por parte de los machos de cada especie, una que requiere de una variación en la señal para diferenciarse de otros machos heteroespecíficos, y otra para distinguirse de los demás machos coespecíficos. En este sentido cada especie podría estar utilizando atributos acústicos diferentes para cada respuesta. Por ejemplo varios trabajos muestran preferencia de las hembras por distintos patrones de duración del canto, una propiedad temporal dinámica (Gerhardt, 1991), seleccionando a los machos coespecíficos por este parámetro (Klump y Gerhardt, 1987; Gerhardt *et al.*, 1996). Por otra parte, la tasa de pulsos podría tener una estrecha relación con la diferenciación respecto a los machos heteroespecíficos. En presencia de heteroespecíficos relacionados, las hembras podrían modificar el óptimo de preferencia hacia señales con valores de tasa de pulso más extremos para evitar apareamientos erróneos. Así, la distribución de los valores de tasa de pulsos de ambas

especies en sintopía (Fig. 37) podría ser explicada por la plasticidad en la interacción entre la emisión de señales por parte de los machos y la preferencia por determinados atributos por parte de las hembras en presencia de la otra especie relacionadas. Estos sitios de sintopía podrían ser ocasionales dentro del área de simpatria, sobre todo teniendo en cuenta que estas especies fueron encontradas en su mayoría reproduciéndose en lagunas temporales que podrían formarse aleatoriamente en esta área de distribución compartida.

Hasta aquí se han discutido las diferentes posibles causas de la variación observada en los caracteres del canto de *O. cordobae* y *O. americanus* coexistiendo en sintopía, en comparación con las poblaciones coespecíficas en alopatria. Siguiendo el trabajo de Lemmon (2009) para poder determinar si este patrón responde a un desplazamiento de los caracteres del canto o bien a la plasticidad comportamental de estas especies, sería considerablemente útil un estudio de fonotaxis, el cual permitirá comparar las respuestas de hembras sintópicas y alopátricas a estímulos pareados representando señales coespecíficas (sintópicas y alopátricas) y heteroespecíficas. Aunque los trabajos que proponen desplazamiento de caracteres, en su mayoría incluyendo cantos de anuros (ej.: Blair, 1955; Littlejohn, 1965; Fouquette, 1975; Loftus-Hills y Littlejohn, 1992), fueron realizados utilizando diferentes poblaciones alopátricas y sintópicas (como en este estudio), resulta muy difícil establecer la ocurrencia de este proceso cuando no puede estudiarse en una única población, previa y posteriormente al contacto con otra especie relacionada.

6. CONSIDERACIONES FINALES

Históricamente se han desarrollado pocos estudios sobre zonas de contacto entre especies relacionadas de anuros, incluyendo pares crípticos diplo/poliploides. Este hecho se debe principalmente a que no existen demasiados escenarios naturales que brinden esta posibilidad. El presente trabajo constituye el primer estudio de este tipo en nuestro país, donde actualmente se reconocen dos complejos crípticos diplo/poliploides, *O. cordobae/O. americanus* ($4n$) y *Ceratophrys cranwelli/C. ornata* ($8n$), y un complejo poliploide/poliploide, *Pleurodema kriegi* ($4n$)/*P. cordobae* ($8n$).

A partir de la investigación realizada se pueden resaltar algunas consideraciones generales que se desprenden del relevamiento, análisis y discusión de los datos obtenidos:

➤ Los resultados obtenidos permitieron confirmar las diferencias entre estas especies, reportadas por otros autores. En este sentido, y a diferencia de otros trabajos, en el presente estudio se incluyó un número muy importante de poblaciones, y en el caso particular de *O. cordobae*, se abarcó una gran parte de su distribución geográfica. Esto permitió evaluar el grado de diferenciación entre especies considerando la variación que puede existir dentro de cada especie. Además, durante este estudio se relevaron 21 nuevos puntos de distribución para *O. cordobae* y *O. americanus*, mediante los cuales se pudo delimitar las áreas de distribución más extrema para cada especie y establecer así las zonas de contacto entre ellas.

➤ La eritrometría demostró ser un análisis rápido y eficiente para el esclarecimiento de la ploidía en este complejo de especies crípticas sin la necesidad de sacrificar a los individuos. La puesta a punto de la técnica, la determinación de un tamaño corporal mínimo y el establecimiento de un valor límite del tamaño de eritrocitos permitieron, no solo la identificación de las diferentes poblaciones relevadas, sino también de los individuos de una y otra especie coexistiendo en sintopía. En este

último caso, se confirmó la ploidía mediante citogenética en aquellos individuos que mostraron valores cercanos al límite establecido, aunque en ningún caso se encontraron ejemplares con ploidía intermedia.

➤ El análisis citogenético permitió la confirmación de la ploidía de las diferentes poblaciones relevadas. Los cariotipos de los individuos sintópicos mostraron diferencias en la morfología de algunos de los pares de cromosomas en ambas especies, con respecto a los cariotipos coespecíficos construidos en el presente trabajo y los reportados por otros autores. Debido a que la citogenética fue utilizada en este trabajo principalmente para confirmar la ploidía de los individuos, no se construyó un número mayor de cariotipos de individuos sintópicos que permitieran corroborar si esta variación observada es una característica de estas poblaciones. En este sentido, sería necesario en futuros estudios construir un mayor número de cariotipos de individuos de *O. cordobae* y *O. americanus* pertenecientes a esta localidad para establecer, en base a la clasificación morfológica que se obtenga, si se repiten estas diferencias encontradas respecto a otras poblaciones de la misma especie.

➤ La mayoría de las poblaciones correspondientes a la especie *O. americanus* presentaron diacinesis conformadas principalmente por multivalentes, lo cual corrobora lo asumido por otros autores sobre su posible origen autoploiploide. Sin embargo, en individuos sintópicos de *O. americanus* se encontraron mayor cantidad de bivalentes, lo cual podría reflejar procesos de diploidización y con ello un origen más antiguo de estas poblaciones respecto de las demás poblaciones analizadas.

➤ Como ocurre en la mayoría de las especies de anuros, las hembras de *O. cordobae* y *O. americanus* mostraron valores morfométricos mayores a los de sus respectivos machos coespecíficos. Este resultado era esperado, debido a que no se observaron en este estudio, ni fue reportado en la bibliografía, la presencia de encuentros agresivos (selección intrasexual) entre machos que justificara un mayor tamaño de estos respecto al tamaño de las hembras. Así, el mayor tamaño de las

hembras podría otorgarles una ventaja reproductiva dada por una relación positiva entre el volumen de huevos y su tamaño corporal.

➤ Las diferencias morfométricas entre los machos de ambas especies crípticas estuvieron relacionadas con la morfología de la cabeza, donde *O. americanus* mostró un mayor tamaño y una forma más alargada, en un plano longitudinal, que su contraparte diploide *O. cordobae*. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en el largo total del cuerpo es un resultado relativamente común entre pares de especies diplo/poliploides relacionadas, debido a que, en vertebrados, la poliploidía parece tener poco o ningún efecto en el tamaño del cuerpo. Este hecho podría estar relacionado a que, en animales poliploides, el aumento en el tamaño celular debido al incremento del contenido de DNA suele acompañarse por una disminución en el número total de células.

➤ El análisis multivariado de los datos morfométricos mostró una mayor diferenciación entre poblaciones alopátricas de cada especie que entre poblaciones sintópicas. Estos resultados se reflejan también en el análisis univariado, en donde un mayor número de variables mostraron diferencias significativas en individuos alopátricos. De esta manera, los resultados obtenidos se alejan de los resultados esperados bajo la hipótesis del desplazamiento de caracteres. Adicionalmente, la ausencia de evidencias de combate activo entre machos, reforzado por el menor tamaño de estos en relación a las hembras en ambas especies podría sugerir que los caracteres morfológicos externos no tendrían una influencia importante en el reconocimiento y elección de machos coespecíficos por parte de las hembras. En este sentido, en este par de especies crípticas la discriminación parece basarse en los cantos nupciales emitidos por los machos, y la maquinaria morfológica que actúa en la producción de señales acústicas, no necesariamente difiere de forma apreciable.

➤ Las especies *O. cordobae* y *O. americanus* mostraron diferencias acústicas notables, excepto en la única variable espectral, la frecuencia dominante del canto. Si

bien es conocido que en muchas especies de anuros se ha reportado una fuerte correlación negativa entre el tamaño corporal y la frecuencia del canto, este parámetro acústico no evidenció una variación clinal a lo largo de la distribución analizada para ninguna de las especies, siendo coherente este resultado con la ausencia de asociación encontrada entre el tamaño corporal y la latitud.

➤ Aunque todos los parámetros temporales del canto mostraron diferencias significativas entre *O. cordobae* y *O. americanus*, la tasa de pulsos parecería ser la variable que más influye en el reconocimiento de especie. La tasa de pulsos es reportada como una propiedad estática en muchas especies y las características observadas en el presente estudio evidencian que en este par de especies actuaría de manera similar. En el análisis entre poblaciones realizado en el presente estudio, la tasa de pulsos fue el parámetro que mostró mayor variabilidad a este nivel y entre especies, siendo estos resultados acordes a los encontrados en otras especies de anuros. Como fue reportado en otros trabajos, la especie *O. cordobae* presentó una tasa de pulsos mayor que *O. americanus*. Este hecho se debe principalmente a que los cantos de los individuos diploides presentan pulsos e interpulsos más cortos, además de un mayor número de pulsos por canto.

➤ Los análisis dentro de cada especie no mostraron relaciones entre las distancias geográficas y las distancias acústicas, pero sí fueron encontradas asociaciones moderadas de algunas variables con respecto a la latitud. La duración del interpulso y la tasa de pulsos fueron las únicas variables que mostraron una variación clinal en ambas especies, aun cuando las poblaciones sintópicas fueron excluidas del análisis, aunque en este caso su asociación con la latitud fue más leve. De acuerdo a lo observado ambas especies muestran una menor duración del intervalo entre pulsos en simpatria, causando un aumento en su tasa de pulsos. En ambas especies, la duración del interpulso aumenta a medida que se avanza hacia las poblaciones alopátricas, con la consiguiente disminución en la tasa de pulsos.

➤ El análisis multivariado de los cantos y las distancias acústicas calculadas muestran una notable diferenciación entre poblaciones sintópicas y alopátricas dentro de cada especie. Este hecho se debe a que existe una mayor diferenciación entre las especies en sintopía, en relación a las diferencias encontradas entre especies en alopatría. Los resultados obtenidos parecerían ser consistentes con el hecho de que la segregación acústica observada entre poblaciones sintópicas y alopátricas de las dos especies en estudio podría estar explicadas por un desplazamiento en componentes básicas del canto de advertencia de los individuos que habitan en zonas de contacto. Sin embargo, existen pocos ejemplos bien documentados en donde pueda demostrarse la ocurrencia de eventos de desplazamiento de caracteres y refuerzo, aunque la mayoría de estos incluyen desplazamiento sobre caracteres del canto de advertencia de diferentes especies de anuros.

➤ Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el canto de advertencia entre *O. cordobae* y *O. americanus* también en alopatría. Por esta razón no existiría ninguna necesidad lógica de una mayor divergencia en las señales de los machos. Más bien, la selección podría haber actuado sobre la selectividad de las hembras. Este también podría ser un agente causal esperado debido a que los apareamientos erróneos podrían tener usualmente efectos más severos sobre el éxito reproductivo de las hembras más que en el de los machos. En este caso, la variación de las señales podría reflejar las diferencias entre poblaciones en las preferencias de pareja, las cuales pueden tener o no algún significado adaptativo. Entonces, las hembras de estas especies podrían estar discriminando entre diferentes cantos y eligiendo a los machos sobre esta base, generando así una selección sexual sobre determinados atributos del canto, principalmente sobre la tasa de pulsos. Los resultados encontrados podrían ser explicados mediante un posible cambio en la preferencia de los óptimos por parte de las hembras, en presencia de machos de especies cercanamente relacionadas con el fin de evitar apareamientos erróneos. Estudios de fonotáxis serían necesarios para evaluar esta posible causa.

➤ Por otra parte, si el aislamiento reproductivo entre *O. cordobae* y *O. americanus* estuviera dado por el evento de poliploidización en sí, o bien reforzado por selección previamente al establecimiento de la simpatria, en zonas de contacto secundarias, se podría esperarse que las hembras pudieran reconocer y discriminar a sus coespecíficos sin que el desplazamiento de caracteres o el refuerzo hayan ocurrido sobre los atributos de las señales de los machos. En este caso dos situaciones pueden ser posibles: 1) en presencia de machos heteroespecíficos, las hembras podrían preferir señales con valores de atributos más extremos, dentro del rango de variabilidad de ese carácter, o 2) estas diferencias pueden surgir a partir de una respuesta comportamental de los machos, produciendo una variación instantánea en ese atributo del canto ante la presencia de un macho vocalizador heteroespecífico cercano a su sitio de canto (interferencia). En ambos casos no habría ninguna fuerza actuando, y lo observado podría ser atribuido a la plasticidad de los individuos para moverse dentro de un rango de valores de un carácter tanto desde la producción (en los machos), como desde la preferencia (en las hembras). En este sentido, es necesario considerar que estos sitios de sintopía hallados en lagunas temporales podrían ser ocasionales dentro del área de simpatria, y por tal razón no siempre las mismas poblaciones podrían encontrarse en contacto.

➤ La presencia de híbridos entre *O. cordobae* y *O. americanus* no ha sido reportada hasta el momento en la naturaleza. Cruces artificiales realizados por Beçak *et al.* (1970) y Beçak y Beçak (1974) mostraron que el aislamiento reproductivo estaría basado en barreras pre-reproductivas y no en una viabilidad reducida de los híbridos. Los resultados muestran que las diferencias acústicas entre estas especies son fuertes y esto queda demostrado en la ausencia hasta el momento de evidencias de cruces erróneos. Sin embargo, Pereyra *et al.* (2009) reportaron un ejemplar híbrido natural entre *O. cordobae* y *O. occidentalis*. Estas especies presentan diferencias morfológicas y, especialmente, acústicas notablemente mayores que las evidenciadas entre *O. cordobae* y *O. americanus*. Teniendo en cuenta, además, los resultados obtenidos en el análisis morfométrico, en donde los individuos sintópicos de ambas especies no mostraron diferencias, y que los machos de estas especies presentan comportamiento

satélite, se podrían producir apareamientos accidentales de parejas no coespecíficas que podrían dar origen a ejemplares híbridos. De encontrarse híbridos por esta causa, sería de esperar que se presenten en muy baja proporción.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir del desarrollo de la presente investigación se cumplieron todos los objetivos planteados en el proyecto de Tesis original. Algunos resultados obtenidos fueron presentados en diferentes Jornadas y Congresos de la especialidad, y permitieron la publicación de trabajos científicos asociadas al tema y a las especies en estudio (Ver Anexo I). Otros resultados están siendo incluidos en nuevos manuscritos, algunos en redacción y otros enviados recientemente para su publicación en Revistas especializadas. Esto demuestra que existe un gran interés por la temática abordada así como también por estos poco comunes complejos de especies cercanamente relacionadas, que presentan diferentes niveles de ploidía.

Por otra parte, el desarrollo de este trabajo trae asociado nuevas inquietudes, las cuales deberían ser abordadas en un futuro para una mejor comprensión de los procesos que actúan en estos sitios tan particulares que representan las zonas de contacto.

Entre las cuestiones quedan planteadas para su resolución, en próximos estudios, se encuentran aquellas relacionadas directamente con la variación acústica intra e interespecífica observada. El desarrollo de diseños de experiencias fonotácticas, en el cual los individuos son sometidos a emisiones pareadas de estímulos acústicos, resultaría adecuado para resolver una serie de cuestiones que podrían ayudar a dilucidar algunas inquietudes surgidas: ¿Existe preferencia de las hembras por determinados atributos de los cantos de los machos? ¿Pueden las hembras reconocer los cantos coespecíficos? ¿Existen diferencias en la elección de las hembras ante cantos de individuos coespecíficos sintópicos o alopátricos? ¿Los machos varían parámetros de sus cantos ante la interferencia ejercida por el canto de otros machos co- y heteroespecíficos? ¿Es la tasa de pulso uno de esos parámetros?

Además de estas aproximaciones etológicas, sería recomendable el desarrollo de otros tipos de estudios. Desde una perspectiva ecológica, sería interesante la realización de estudios básicos en áreas de simpatria sobre dinámica poblacional, movilidad de los individuos, preferencia de hábitats, elección de sitios reproductivos y preferencias de sitios de canto, entre otros. Esta información resultaría de gran utilidad para conocer como se estructuran las poblaciones de *O. cordobae* y *O. americanus* en las áreas de

simpatría y en función de ello, establecer que tipo de disposición espacial presentan las posibles zonas de contacto. Sin embargo, uno de los principales problemas que se presentan en este tipo de estudios es la condición críptica de estas especies, la cual impide la identificación específica *in situ* de los individuos.

Resulta también necesario el planteamiento de estudios moleculares que permitan obtener información sobre el grado de diferenciación y flujo génico entre poblaciones, principalmente en las áreas de simpatría y sintopía. Para este fin, durante el desarrollo de este trabajo, se han extraído y se conservan en la actualidad muestras de tejidos obtenidos de cada individuo capturado y procesado luego en laboratorio. Además, a partir de los resultados del análisis molecular se podrían esclarecer cuestiones relacionadas al origen de las zonas de contacto reportadas hasta el presente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amaro, R.C., Pavan, D., Trefaut Rodrigues, M. 2009. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim and Carmaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). *Zootaxa* 2071:61–68.
- AmphibiaWeb, 2010. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [aplicación web]. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponible en: <http://amphibiaweb.org/>. (Acceso: 25 de Agosto de 2010).
- Andrew, W. 1965. Comparative Hematology. Grune & Stratton, New York.
- Angulo, A. and Reichle, S. 2008. Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological Journal of the Linnean Society* 152, 59-77.
- Arak, A. 1983. Male–male competition and mate choice in anuran amphibians. In: Mate Choice (Ed. by P. Bateson), pp. 181–210. Cambridge: Cambridge University Press.
- Arak, A. 1988. Sexual dimorphism in body size: A model and a test. *Evolution* 42: 820-825.
- Arntzen, P. and Bauer A.M. 1996. Species and species concepts- too many or too few? *Amphibia Reptilia* 17, 321-323.
- Arturi, M. 2005. Situación Ambiental en la Ecoregión Espinal. En: Brown, A.D.; Martínez Ortiz, U.; M Acerbi y Corcuera, J. (eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina. 587 pp.
- Bachmann, K. and Bogart, J.P. 1975. Comparative cytochemical measurements in the diploid-tetraploid species pair of hylid frogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 15: 186-194.
- Barale, G. de, Maria, G.A., di Tada, I.E. y Lisanti, J.A. 1981. Presencia de *Odontophrynus americanus* (Anura, Leptodactylidae) tetraploide en la provincia de Córdoba. *Revista UNRC* 1(12): 121-125.
- Baraquet, M., Salas, N. and di Tada, I.E. 2007. Variación geográfica en el canto de advertencia de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) en Argentina. *Revista Española de Herpetología* 21: 107-118.

- Barrio, A. 1964. Caracteres eto-ecológicos diferenciales entre *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron) y *O. occidentalis* (Berg) (Anura, Leptodactylidae). *Physis* 24, 385-390.
- Barrio, A. and Pistol de Rubel, D. 1972. Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de *Odontophrynus americanus*; (Anura, Leptodactylidae) relacionada con otros rasgos taxonómicos. *Physis* 31(82): 281-291.
- Beçak, M.L. and Beçak, W. 1974. Studies of polyploid amphibians-karyotype evolution and phylogeny of the genus *Odontophrynus*. *Journal of Herpetology* 8(4): 337-341.
- Beçak, M.L. and Beçak, W. 1998. Evolution by polyploidy in Amphibia: new insights. *Cytogenetics and Cell Genetics* 80: 28-33.
- Becak, M.L. and Kobashi, L.S. 2004. Evolution by polyploidy and gene regulation in Anura. *Genetics and Molecular Research* 3: 195-212.
- Beçak, M.L., Beçak, W. and Rabello M.N. 1966. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma* 19: 188-193.
- Beçak, M.L., Beçak, W. and Rabello, M.N. 1967. Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae). I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma* 22: 192-207.
- Beçak, M.L., Beçak, W. and Vizotto L.D. 1970. A diploid population of the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus* and the artificial intraespecific triploid hybrid. *Experientia* 26: 545-546.
- Benbassat, J. 1974. The transition from tadpole to frog hemoglobin during natural amphibian metamorphosis. *Journal of Cell Science* 15: 347-357.
- Benedix, J.H. and Howard, D.J. 1991. Calling song displacement in a zone of overlap and hybridization. *Evolution* 45: 1751-1759.
- Bernal, X., Guarnizo, C. and Lüddecke, H. 2005. Geographic variation in the advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura: Dendrobatidae), from the Colombian Andes. *Herpetologica* 61: 395-408.
- Bernal, M.H. and Clavijo, J.A. 2009. An essay on precision in morphometric measurements in anurans: inter-individual, intra-individual and temporal comparisons. *Zootaxa* 2246: 32-44.
- Bevier, C.R. 1997. Breeding activity and chorus tenure of two Neotropical hyliid frogs.

- Herpetologica* 53: 297-311.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winke, K., Ingram, K.K. and Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22:148-155.
- Bionda, C., Salas, N. y di Tada, I. 2006. Variación bioacústica en poblaciones de *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leptodactylidae) en Córdoba, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 20: 95-104.
- Blair, A. P. 1947. The male warning vibration in *Bufo*. *American Museum Novitates* 1344: 1-7.
- Blair, W.F. 1955. Mating call and stage of speciation in the *Microhyla olivacea*-*M. carolinensis* complex. *Evolution* 9: 469-480.
- Blair, W.F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *American Naturalist* 92:27-51.
- Blair, W.F. 1964. Isolating mechanisms and interspecies interactions in anuran amphibians. *The Quarterly Review of Biology* 39(4): 334-344.
- Blair, W.F. 1968. Amphibians and reptiles. *In: Animal Communication*. Sebeok, T.A. (Ed.), pp. 289-310. Bloomington: Indiana University Press.
- Blaustein, A.R. and Wake, D.B. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American* 272: 52-59.
- Bogart, J.P. 1967. Chromosomes of the South American amphibian family Ceratophrydidae with a reconsideration of the taxonomic status of *Odontophrynus americanus*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 9: 531-542.
- Bogart, J.P. 1980. Evolutionary significance of polyploidy in amphibians and reptiles. *In: Polyploidy, Biological Relevance*. 341-378. Lewis W.H. (Ed.). New York, London: Basic Life Sciences.
- Bogart, J.P. and Tandy, M. 1976. Polyploid amphibians: three more diploid-tetraploid cryptic species of frogs. *Science* 193:334-335.
- Bogart, J.P. and Wasserman, A.O. 1972. Diploid-polyploid species pairs: A possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11: 7-24.
- Bogert, C.M. 1960. The influence of sound on the behavior of amphibians and reptiles. *In: Animal Sound and Communication*. Lanyon, W.W. and Tavolga, W.N. (Eds.). Washington, D.C.: American Institute of Biological Sciences.

- Borteiro, C., Kolenc, F., Pereyra, M.O., Rosset, S.D. and Baldo, D. 2010. A diploid surrounded by polyploids: tadpole description, natural history and cytogenetics of *Odontophrynus maisuma* Rosset from Uruguay (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa* 2611: 1-15.
- Bosch, J. and Márquez, R. 1996. Acoustic competition in male midwife toads *Alytes obstetricans* and *Alytes cisternasii*: Response to neighbor size and calling rate. Implications for female choice. *Ethology* 102:841-855.
- Boul, K.E., Funk, W.C., Darst, C.R., Cannatella, D.C. and Ryan, M.J. 2007. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society of London, Serie B*, 274, 399–406.
- Bradbury, J.W. and Vehrencamp, S.L. 1998. Principles of Animal Communication. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Brenowitz, E.A. and Rose, G.J. 1994. Behavioural plasticity mediates aggression in choruses of the Pacific treefrog. *Animal Behaviour* 47: 633–641.
- Bridarolli, M. E. and di Tada I.E. 1996. Algunos aspectos de la geografía física de la provincia de Córdoba. *En: Biodiversidad de la provincia de Córdoba: Fauna. Vol. I.* di Tada, I.E. y Bucher, E.H. (eds.), pp. 15-38.
- Broyles, R.H. 1981. Changes in the blood during amphibian metamorphosis. 461-490. *In: Metamorphosis. A problem in developmental biology.* 2nd Edition. Gilbert, L.I. and Frieden, E. (Eds). Plenum Press. New York.
- Brown, W.D. 1993. The cause of size-assortative mating in the leaf beetle *Trirhabda canadensis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 33: 151-157.
- Brown, L.E. and Littlejohn, M.J. 1972. Male release call in the *Bufo americanus* group. *In: Evolution in the Genus Bufo.* Blair, W.F. (Ed.). Austin: University of Texas Press.
- Brown, W.L. and Wilson, E.O. 1956. Character displacement. *Systematic Zoology* 5: 49-64.
- Brown, A.D. y Pacheco, S. 2006. Propuesta de actualización del mapa ecorregional de la argentina. *En: La Situación Ambiental Argentina 2005.* Brown, A.D.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M. y Corcuera, J. (Eds.). Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina. 587 pp.

- Brown, A.D.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M y Corcuera, J. 2005. La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina. 587 pp.
- Bucher, E.H. y Abalos, J.W. 1979. Fauna. Geografía Física de la Provincia de Córdoba. Vázquez, J.B., Miatello, R.A. y Roqué M.E (Eds.). Buenos Aires, Editorial Boldt, pp. 369-434.
- Burkart, R., Bárbaro, N.O., Sánchez, R.O. y Gómez, D.A. 1999. Eco-regiones de la Argentina. Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, 42 pp.
- Butlin, R. 1987. Speciation by reinforcement. *Trends in Ecology and Evolution* 2: 8-13.
- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology. In: Speciation and its consequences. Otte, D., Endler, J.A. (Eds.), pp. 28-59. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Calvalcanti, M.J. (2005) *Mantel for windows*, Version 1.18. Freeware available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Campbell, J.A. and Savage, J.M. 2000. Taxonomic reconsideration of Middle American frogs of the *Eleutherodactylus rugulosus* group (Anura: Leptodactylidae): A reconnaissance of subtle nuances among frogs. *Herpetological Monographs* 14: 186-292.
- Capitanelli, R.G. 1979a. Clima. En: Geografía física de la provincia de Córdoba. Vázquez, J.B., Miatello R.A. and Roqué, M.E. (Eds.), pp. 45-138. Editorial Boldt, Buenos Aires.
- Capitanelli, R.G. 1979b. Geomorfología. En: Geografía Física de la Provincia de Córdoba. Vázquez, J.B., Miatello, R.A. y Roqué, M.E. (Eds.), pp. 213-296. Buenos Aires, Editorial. Boldt.
- Caramaschi, U. 1996. Nova especie de *Odontophrynus* Reinhardt & Lütken, 1862 do Brasil Central (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Boletim Do Museu Nacional, Rio de Janeiro, Zoologia* 367:1-8.
- Castellano, S. and Giacoma, C. 1998. Stabilizing and directional female choice for male calls in the European green toads. *Animal Behaviour* 56: 275-287.
- Castellano, S. and Balleto, E. 2002. Is the partial Mantel test inadequate? *Evolution* 59(9): 1871-1873.

- Castellano, S., Giacoma, C. and Dujsebayaeva, T. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 70: 341-360.
- Castellano, S., Giacoma, C., Dujsebayaeva, T., Odierna, G., and Balletto E. 1998. Morphometrical and acoustical comparison between diploid and tetraploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 257-281.
- Castellano, S., Rosso, A., Doglio, S., and Giacoma, C. 1999. Body size and calling variation in the green toad, *Bufo viridis*. *Journal of Zoology* (London) 248: 83-90.
- Cei, J.M. 1972. Segregación corológica y procesos de especiación por aislamiento en anfibios de la Pampa de Achala, Córdoba. *Acta zoológica Lilloana* 29: 233-246.
- Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.) Monog. N° 2*. 2609 pp.
- Cei, J.M. 1985. Un nuevo y peculiar *Odontophrynus* de la Sierra de Guasayán, Santiago del Estero, Argentina (Anura, Leptodactylidae). *Cuadernos de Herpetología* 1: 1-13.
- Cei, J.M. 1987. Additional notes to Amphibians of Argentina: An update, 1980-1986. *Monitore Zoologico Italiano, Suppl.*, 98 pp.
- Cei, J.M. and Crespo, E.G. 1982. Differences in larval morphology of allopatric isolated populations of the *Odontophrynus occidentalis* group from western Argentina. *Arquivos do Museu Bocage (Serie A)* 1(14): 335-340.
- Cherry, L.M., Case, S.M. and Wilson, A.C. 1978. Frog perspective on the morphological difference between humans and chimpanzees. *Science* 200: 209-211.
- Christiansen, D.G., Fog, K., Pedersen, B.V., Boomsma, J.J. 2005. Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark. *Evolution* 59: 1348-1361.
- Church, G. 1961. Auxetic growth in the Javanese toad, *Bufo melanostictus*. *Science* 133: 2012-2014.
- Cocroft, R.B. and Ryan, M.J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* 49:283-303.
- Coniglio, J.E. y Esparza, A.M. 1988. Geología del sector sur del Batolito Cerro Áspero-Alpa Corral, provincia de Córdoba, Argentina. *Actas del V Congreso Geológico Chileno*. Tomo II: 1-15.
- Coyne, J.A. and Orr, H.A. 1989. Two rules of speciation. *In: Speciation and its*

- Consequences. Otte, D. and Endler, J. (Eds.), pp. 180-207. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Crespi, B.J. 1989. Causes of assortative mating in arthropods. *Animal Behaviour* 38, 980-1000.
- Crump, M.L. 1974. Reproductive strategies in a tropical community. Miscellaneous Publication 61, University of Kansas Museum of Natural History, Lawrence, Kansas, Estados Unidos.
- Cruz, R., Carballo, M., Conde-Padin, P. and Rolan-Alvarez, E. 2004. Testing alternative models for sexual isolation in natural populations of *Littorina saxatilis*: indirect support for by-product ecological speciation? *Journal of Evolutionary Biology* 17: 288-293.
- De Almeida, T.M.B., Ruiz, I.R.G. and Beçak, W. 1986. Ribosomal gene activity detected by silver staining in two diploid populations of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura) from southern Brazil. *Revista Brasileira de Genetica* 9:433-437.
- Delestrade, A. 2001. Sexual size dimorphism and positive assortative mating in Alpine choughs (*Pyrrhocorax graculus*). *Auk* 118: 553-556.
- di Tada I.E., Martino, A. and Sinsch, U. 2001. Release vocalizations in neotropical toads (*Bufo*): Ecological constraints and phylogenetic implications. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 39: 13-23.
- di Tada, I.E., Barla, M.J., Martori, R.A. y Cei, J.M. 1984. *Odontophrynus achalensis* una nueva especie de anfibio de la Pampa de Achala (Cordoba, Argentina). *Historia Natural* 4(17): 149-155.
- di Tada, I.E., Zavattieri, M.V., Bridarolli, M.E., Salas, N.E. y Martino, A.L. 1996. Anfibios anuros de la provincia de Córdoba. *En: Biodiversidad de la provincia de Córdoba: Fauna. Vol. I. Di Tada, I.E. y Bucher, E.H. (Eds.), pp. 191-212.*
- Dobzhansky, T. 1937. *Genetics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press.
- Dobzhansky, T. 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *American Naturalist* 74: 312-321.
- Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the origins of species*. Columbia University Press, New York.
- Dorn, A.R. and Broyles, R.H. 1982. Erythrocyte differentiation during the metamorphic

- hemoglobin switch of *Rana catesbeiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 5592-5596.
- Dubois, A. 2005. Amphibia Mundi. 1.1. An ergotaxonomy of Recent amphibians. *Alytes* 23: 1-24.
- Duellman, W.E. 2003. Leptodactylid frogs (Leptodactylidae). In: Grzimek's animal life encyclopedia, 2nd ed. Vol. 6. Amphibians. Duellman, W.E. (Ed.), pp. 155-171. Detroit: Gale Group.
- Duellman, W.E., Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw Hill Publishing Company, New York, New York, U.S.A.
- Emerson, S.B. 2001. Male advertisement calls: behavioral variation and physiological processes, In: Anuran Communication. Ryan, M.J. (Ed.), pp. 36-44. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Emlen, S.T. and Oring, L.W. 1977. Ecology, sexual selection and evolution of mating systems. *Science* 197(4300): 215-223.
- Endler, J.A. 1992. Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *The American Naturalist* 139:125-153.
- Endler, J.A. and Foster, S.A. 1998. Geographic variation of behaviour. Oxford: Oxford University Press.
- Endler, J.A. and Houde, A.E. 1995. Geographic variation in female preferences for male traits in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 49: 456-468.
- Erdtmann, L. and Amézquita, A. 2009. Differential Evolution of Advertisement Call Traits in Dart-Poison Frogs (Anura: Dendrobatidae). *Ethology* 115: 801-811.
- Fankhauser, G. 1945. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *The Quarterly review of biology* 20: 20-78.
- Formas, J. R. 1991. The karyotypes of the Chilean frogs *Eupsophus emiliopugini* and *E. vertebralis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Proceedings of the Biological Society Washington* 104(1): 7-11.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmill, N.J. 2007. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *PLoS ONE* 2(10): e1109.
- Fouquette, M.J. 1975. Speciation in chorus frogs. I. reproductive character displacement in the *Pseudacris nigrita* complex. *Systematic Zoology* 24: 16-23.

- Foster, S.A. and Cameron, S.A. 1996. Geographic variation in behavior: a phylogenetic framework for comparative studies. *In: Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Martins, E.P. (Ed.), pp. 138-165. New York: Oxford University Press.
- Foxong, E.H. 1964. Blood and respiration. *In: Physiology of the Amphibian*. Moore, J.H. (Ed.), pp. 151-209. Academic Press, New York.
- Frost, D.R. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at [http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History](http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American%20Museum%20of%20Natural%20History), New York, USA.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. y Wheeler, W.C. 2006. The amphibian tree of life. *American Museum of Natural History Bulletin* 297: 1-370.
- Gabor, C.R. and Ryan, M.J. 2001. Geographical variation in reproductive character displacement in mate choice by male sailfin mollies. *Proceedings of the Royal Society B* 268: 1063-1070.
- Gallardo, J.M. 1966. Zoogeografía de de los Anfibios Chaqueños. *Physis* 26, 67-81.
- Gallardo, J. M. 1987. Anfibios argentinos: Guía para su identificación. Buenos Aires, Argentina. Biblioteca Mosaico, 98 pp.
- Gans, C. 1974. Biomechanics: An Approach to Vertebrate Biology Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 261pp.
- Gerhardt, H.C. 1983. Communication and the environment. *In: Communication and Social Interactions*. Halliday, T. and Slater, P. (Eds.), pp. 82-113. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Gerhardt, H.C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour* 42(4): 615-635.
- Gerhardt, H.C. 1994a. The evolution of vocalization in frogs and toads. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 25: 293-324.
- Gerhardt, H.C. 1994b. Reproductive character displacement of female mate choice in the gray treefrog *Hyla chrysoscelis*. *Animal Behaviour* 47: 959-969.

- Gerhardt, H.C. and Davis, M.S. 1988. Variation in the coding of species identity in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution* 42: 556-565.
- Gerhardt, H.C. and Huber, F. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions. University of Chicago Press, Chicago and London.
- Gerhardt, H.C., Dyson, M.L. and Tanner, S.D. 1996. Dynamic properties of the advertisement calls of gray tree frogs: patterns of variability and female choice. *Behavioral Ecology* 7: 7-18.
- Ghiselin, M.T. 1974. The economy of nature and the evolution of sex. University of California Press, Berkeley, California, Estados Unidos.
- Giacoma C. and Castellano, S. 2001, Advertisement call variation and speciation in the *Bufo viridis* complex. In: Anuran Communication. Ryan, M.J. (Ed.), pp. 205-219. Smithsonian Press, Washington, D.C.
- Giacoma, C., Zugolaro, C. and Beani, L. 1997. The advertisement calls of the green toad (*Bufo viridis*); variability and role in mate choice. *Herpetologica* 53:(4): 454-464.
- Girgenrath, M. and Marsh, R.L. 1997. In vivo performance of trunk muscles in tree frogs during calling. *The Journal of Experimental Biology* 200: 3101-3108.
- Given, M.F. and McKay, D.M. 1990. Variation in the citrate synthase activity in calling muscles of the carpenter frogs, *Rana virgatipes*. *Copeia* 1990: 863-867.
- Glaw, F. and Köhler, J. 1998. Amphibian species diversity exceeds that of mammals. *Herpetological Review* 29: 11-12.
- Grafe, T.U. 1997. Costs and benefits of mate choice in the lek-breeding reed frog, *Hyperolius marmoratus*. *Animal Behaviour* 53(5):1103-1117.
- Grant, P.R. 1972. Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* 4: 39-68.
- Gregory T.R. 2002. A bird's-eye view of the C-value enigma: genome size, cell size, and metabolic rate in the class Aves. *Evolution* 56: 121-130.
- Gregory, T.R. 2003. Variation across amphibian species in the size of the nuclear genome supports a pluralistic, hierarchical approach to the C-value enigma. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 329-339.
- Grenat, P.R., Salas, N.E. and Martino, A.L. 2009b. Erythrocyte size as diagnostic

- character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa* 2049: 67-68.
- Grenat, P.R., Bionda, C., Salas, N.E. and Martino, A.L. 2009a. Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*. *Amphibia-Reptilia* 30: 141-145.
- Grenat, P.R., Zavala Gallo, L.M., Salas, N.E. and Martino, A.L. 2009c. The tadpole of *Odontophrynus cordobae* Martino & Sinsch, 2002 (Anura: Cycloramphidae) from central Argentina. *Zootaxa* 2151: 66-68.
- Grenat, P.R., Zavala Gallo, L.M., Salas, N.E. and A.L. Martino. Reproductive behaviour and development dynamics of *Odontophrynus cordobae* (Anura, Cycloramphidae). En revision (*Journal of Natural History*).
- Haas, A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). *Cladistics* 19: 23-90.
- Haddad, C.F.B. and Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55:207-217.
- Hanken, J. 1999. Why are there so many new amphibian species when amphibians are declining? *Trends in Ecology & Evolution* 14:7-8.
- Harari, A.R., Handler, A.M. and Landolt, P.J. 1999. Size-assortative mating, male choice and female choice in the curculionid beetle *Diaprepes abbreviatus*. *Animal Behaviour* 58: 1191-1200.
- Harper, D.G.C. 1991. Communication.. In: Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach. Krebs, R. and Davies, N.B. (Eds.), pp. 374-397. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hartman, F.A., and Lessler, M.A. 1964. Erythrocyte measurements in fishes, amphibians and reptiles. *Biological Bulletin* 126: 83-88.
- Hasebe, T., Kawamura, K. and Kikuyama, S. 1996. Genomic DNA fragmentation in red blood cells of the bullfrog during metamorphosis. *Development, Growth and Differentiation* 38: 605-615.
- Hebets, E.A. and Papaj, D.R. 2005. Complex signal function: developing a framework of testable hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57: 197-214.
- Helfenstein, F., Danchin, E. and Wagner, R.H. 2004. Assortative mating and sexual size dimorphism in black-legged kittiwakes. *Waterbirds* 27: 350-354.

- Herring, K. and Verrell, P. 1996. Sexual incompatibility and geographical variation in mate recognition systems: tests in the salamander *Desmognathus ochrophaeus*. *Animal Behaviour* 52: 279-287.
- Heyer, W.R. 1975. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family *Leptodactylidae*. *Smithsonian Contributions to Zoology* 199: 1-55.
- Heyer, W.R. and Reid, Y.R. 2003. Does advertisement call variation coincide with genetic variation in the genetically diverse frog taxon currently known as *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Leptodactylidae)? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75(1): 39-54.
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L. and Nelson, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31:231-410.
- Highton, R. 1989. Biochemical evolution in the slimy salamanders of the *Plethodon glutinosus* complex in the eastern United States. Part I. Geographic protein variation. *Illinois Biological Monographs* 57:1-78.
- Hillis, D.M., Frost, J.S. and Wright, D.A. 1983. Phylogeny and biogeography of the *Rana pipiens* complex: a biochemical evaluation. *Systematic Zoology* 32:132-143.
- Hinde, R.A. and Tinbergen, N. 1958. The comparative study of species-specific behavior. In: Behavior and Evolution. Roe, A. and Simpson, G.G. (Ed.), pp. 251–268. New Haven: Yale University Press.
- Holloway, A.K., Cannatella, D.C., Gerhardt, H.C. and Hillis, D. 2006. Polyploids with different origins and ancestors form a single sexual polyploid species. *The American Naturalist* 167(4): 88-101.
- Holtfreter, J. 1947. Morphogenesis, crenation and cytolytic reactions of erythrocytes of amphibians. *Journal of Morphology* 80:345-367.
- Hoskin, C.J., Higgie, M., McDonald, K.R. and Moritz, C. 2005. Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature* 437: 1353-1356.
- Hostert, E. E. 1997. Reinforcement: a new perspective on an old controversy. *Evolution* 51: 697–702.
- Howard, D.J. 1993. Reinforcement: origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. In: Hybrid Zones and the Evolutionary Process. Harrison, R.G. (Ed.), pp. 46–69. Oxford: Oxford University Press.
- Howard, R.D. and Young J.R. 1998. Individual variation in male vocal traits and female

- mating preferences in *Bufo americanus*. *Animal Behaviour* 55: 1165-1179.
- Huxley, J. 1966. A discussion on ritualization of behavior in animals and man: introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 251: 249-271.
- Johannesson, K., Rolan Alvarez, E. and Ekendahl, A. 1995. Incipient reproductive isolation between two sympatric morphs of the intertidal snail *Littorina saxatilis*. *Evolution* 49: 1180-1190.
- Keller, M.J. and Gerhardt, H.C. 2001. Polyploidy alters advertisement call structure in gray tree frogs. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268:341-345.
- Kessel, E.L. 1955. The mating activities of balloon flies. *Systematic Zoology*, 4: 97-104.
- Kime, N.M., Burmeister, S.S. and Ryan, M.J. 2004. Female preference for socially variable call characters in the cricket frog, *Acris crepitans*. *Animal Behaviour* 68:1391-1399.
- King, M. 1990. Animal Cytogenetics. Chordata 2: Amphibia. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart, Germany.
- Klump, G.M. and Gerhardt, H.C. 1987. Use of non-arbitrary acoustic criteria in mate choice by female gray tree frogs. *Nature* 326: 286-288.
- Kokubum, M.N.C. and Giaretta, A.A. 2005. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylinae) with endotrophic tadpoles: Systematic implications. *Journal of Natural History* 39: 1745-1758.
- Köhler, J., Vieites, D.R., Bonett, R.M., Garcia, F.H., Glaw, F., Steinke, D. and Vences, M. 2005. New amphibians and global conservation: A boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *Bioscience* 55: 693-696.
- Kolm, N. 2001. Females produce larger eggs for large males in a paternal mouthbrooding fish. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 268: 2229-2234.
- Kolm, N. 2002. Male size determines reproductive output in a paternal mouthbrooding fish. *Animal Behaviour* 63: 727-733.
- Kondo, Y. and Kashiwagi, A. 2004. Experimentally induced autotetraploidy and allotetraploidy in two Japanese pond frogs. *Journal of Herpetology* 38: 381-392.
- Laurent, R.F. 1986. Sous classe des lissamphibiens (Lissamphibia). In *Traité de zoologie, Anatomie, systematique, biologie*, vol. 14. Batraciens, fasc. 1-B. Grassé, P. and Delsol, M. (Eds.), pp. 594-797. Paris: Masson.

- Lavilla, E.O. y Rougés, M. 1992. Reproducción y desarrollo de anuros argentinos. *Serie Divulgación 5. Asociación Herpetológica Argentina 5*: 66 p.
- Lavilla, E.O., Richard, E. and Scrochi, G.J. 2000. Categorización de los Anfibios y Reptiles de la República Argentina. San Miguel de Tucumán: Asociación Herpetológica Argentina.
- Leary, C.J. 1999: Comparison between release vocalizations emitted during artificial and conspecific amplexus in *Bufo americanus*. *Copeia* 1999: 506-508.
- Leary, C.J. 2001. Evidence of convergent character displacement in release vocalizations of *Bufo fowleri* and *Bufo terrestris* (Anura; Bufonidae). *Animal Behaviour* 61:431-438.
- Leary, C.J., Fox, D.J., Shepard, D.B. and Garcia, A.M. 2005. Body size, age, growth and alternative mating tactics in toads: satellite males are smaller but not younger than calling males. *Animal Behaviour* 70(3): 663-671.
- Lee, J.C. 1982. Accuracy and precision in *anuran* morphometrics: artifacts of preservation. *Systematic Zoology* 31: 266-281.
- Leipoldt, M. 1983. Towards an understanding of the molecular mechanisms regulating gene expression during diploidization in phylogenetically polyploid lower vertebrates. *Human Genetics* 65: 11-18.
- Lemmon, E.M. 2009. Diversification of conspecific signals in sympatry: Geographic overlap drives multidimensional reproductive character displacement in frogs. *Evolution* 63:1155-1170.
- Lemmon, A.R., Smajda, C. and Kirkpatrick, M. 2004. Reproductive character displacement is not the only possible outcome of reinforcement. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 177-183.
- Lewis, J.P., Noetinger, S., Prado, D.E. y Barberis, I.M. 2005. Los remanentes de bosques del Espinal en el este de la provincia de Córdoba. *Agromensajes*, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario 13: 23-27.
- Liou, L.W. and Price, T.D. 1994. Speciation by reinforcement of premating isolation. *Evolution* 48: 1451-1459.
- Littlejohn, M.J. 1965. Vocal communication in frogs. *Australian Natural History* 15: 52-55.
- Littlejohn, M.J. 1988. The retrograde evolution of homogamic acoustic signalling

- systems in hybrid zones. *In: The Evolution of the Amphibian Auditory System* Fritzsche, B., Ryan, M.J., Wilczynski, W., Hetherington, T.E. and Walkowiak, W. (Eds), pp. 613-635. John Wiley & Sons, New York,.
- Littlejohn, M.J. 2001. Pattern of differentiation in temporal properties of Acoustic signals of anurans. *In: Anuran Communication*. Ryan, M.J. (ed.), pp. 102-120. Smithsonian Institution Press. Washington. United States of America.
- Loftus-Hills, J.J. and Littlejohn, M.J. 1992. Reinforcement and reproductive character displacement in *Gastrophryne carolinensis* and *G. olivacea* (Anura, Microhylidae) – a reexamination. *Evolution* 46: 896-906.
- Lofts, B. 1974. *Physiology of the Amphibia*. Vol. 2, New York: Academic Press.
- Lopez, P.T., Narins, P.M., Lewis, E.R. and Moore, S.W. 1988. Acoustically induced call modification in the white-lipped frog, *Leptodactylus albilabris*. *Animal Behaviour* 36: 1295-1308.
- Lörcher, B.K. and Schneider, H. 1973. Vergleichende Bio-Akustische Untersuchungen an der Kreuzkröte, *Bufo calamita* (Laur.), und der Wechselkröte, *Bufo v. Viridis* (Laur.). *Zeitschrift für Tierpsychologie* 32: 506-521.
- Lorenz, K. D. 1941. Vergleichende Bewegungsstudien an Anatinen. *J. Ornithol.* 89, Sonderheft: 19-29. *In: 1972. Function and Evolution of Behavior: An Historical Sample from the Pens of Ethologists*. Klopfer, P.H. and Hailman, J.P. (Ed), pp. 231-259. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley.
- Lorenz, K. 1966. Evolution of ritualization in the biological and cultural spheres. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 251: 273-284.
- Lourenço, L.B., Recco-pimentel, S.M. and Cardoso, A.J. 1998. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research* 6:621-628.
- Lynch, J.D. 1971. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs. University of Kansas, Museum of Natural History. *Miscellaneous Publication* 53:1-238.
- Mable, B.K. 2004. Why polyploidy is rarer in animals than in plants: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 453-466.

- Mahony, M.J. and Robinson, E.S. 1980. Polyploidy in the Australian leptodactylid frog genus *Neobatrachus*. *Cromosoma* 81, 199-212.
- Márquez, R. and Bosch, J. 1997. Male advertisement call and female preference in sympatric and allopatric midwife toads. *Animal Behaviour* 54, 1333-1345.
- Marchi, P., Illuminati, O., Macioce, A., Capineri, R., and D'Amato, G. 1983. Genome evolution and polyploidy in *Leucanthemum vulgare* Lam. aggr. (Compositae). Karyotype analysis and DNA microdensitometry. *Caryologia* 36: 1-18.
- Martin, W.F. 1972. Evolution of vocalization in the Genus *Bufo*. In: Evolution in the Genus *Bufo*. Blair, W.F. (ed.), pp. 279-309. Austin: University of Texas Press.
- Martino, A.L. 1999. Análisis estructural de una comunidad de anfibios anuros (Barreto, Córdoba, Argentina). Tesis Doctoral. Departamento de Cs. Naturales. Facultad de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto: 152.
- Martino, A.L. and Sinsch, U. 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *Journal of Zoology (London)* 257: 67-81.
- Martino, A.L., Salas, N.E. and di Tada, I.E. 1999. Geographic distribution of *Odontophrynus americanus*. *Herpetological Review* 30(1): 50.
- Martin, W.F. and C. Gans. 1972. Muscular control of the vocal tract during release signalling in the toad *Bufo valliceps*. *Journal of morphology* 137: 1-27.
- Matson, T.O. 1990. Erythrocyte size as a taxonomic character in the identification of Ohio *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Herpetologica*. 46:457-462.
- Mayr, E. 1976. Evolution and the Diversity of Life: Selected Essays. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.
- McNally, R.C. 1981. On the reproductive energetics of chorusing males: energy depletion, restoration, and growth of two sympatric species of *Ranidella* (Anura). *Oecologia* 51: 181-188.
- Meegaskumbura, M., Bossuyt, F., Pethiyagoda, R., Manamendra-Arachchi, K., Bahir, M., Milinkovitch, M.C., Schneider, C.J. 2002. Sri Lanka: an amphibian hot spot. *Science* 298:379.
- Michiels, N.K., Hohner, A. and Vorndran, I.C. 2001. Precopulatory mate assessment in relation to body size in the earthworm *Lumbricus terrestris*: avoidance of dangerous liaisons? *Behavioral Ecology* 12: 612-618.

- Morello, J. 2004. El conocimiento sobre los bosques de Argentina, su manejo y su conservación: ¿Llegamos a tiempo?”, *En: Ecología y manejo de los bosques de Argentina*. Arturi, M.F., Frangi, J.L. y Goya, J.F. (Eds.). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Müller, H.J. 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *The American Naturalist* 59: 346-353.
- Narins, P.M. 2001. Ectothermy's last stand: Hearing in the heat and cold. *In. Anuran Communication*. Ryan, M.J. (Ed.), pp. 61-70. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Nauta, D. 1972. The meaning of information. Mouton, The Hague.
- Navas, C.A. 1996. Thermal dependency of field locomotor and vocal performance of high-elevation anurans in the tropical Andes. *Journal of Herpetology* 30:478-487.
- Navas, C.A. y Bevier, C.R. 2001. Thermal dependency of calling performance in the eurythermic frog *Colostethus subpunctatus*. *Herpetologica* 57:384-395.
- Nevo, E. and Schneider, H. 1976. Mating call pattern of Green toads in Israel and its ecological correlate. *Journal of Zoology (London)* 178: 133-145.
- Nöller, H.G. 1959. Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflügers Archives of Physiology* 269: 98-100.
- Olafsdottir, G.A., Ritchie, M.G. and Snorrason, S.S. 2006. Positive assortative mating between recently described sympatric morphs of Icelandic sticklebacks. *Biology Letters* 2: 250-252.
- Olsson, M. 1993. Male preference for large females and assortative mating for body size in the sand lizard (*Lacerta agilis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32: 337-341.
- Otronen, M. 1993. Size assortative mating in the yellow dung fly *Scatophaga stercoraria*. *Behaviour* 126: 63-76.
- Otte, D. and Endler, J.A. 1989. Speciation and its consequences. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Otto, S. and Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics* 34:401-437.
- Panhuis, T.M., Butlin, R., Zuk, M. and Tregenza, T. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 364-371.

- Paterson, H.E.H. 1985. The recognition concept of species. *In: Species and speciation*. Vrba, E.S. (Ed.), pp. 21-29. Pretoria: Transvaal Museum,.
- Pereyra, M.O., Martí, D.A., Lescano, J.N., Rosset, S.D. and Baldo, D. 2009. Natural interspecific hybridization in *Odontophrynus* (Anura: Cycloramphidae). *Amphibia-Reptilia* 30: 571-575.
- Petit, C., Bretagnolle, F. and Felber, F. 1999. Evolutionary consequences of diploid-tetraploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology & Evolution*. 14(8): 305-311.
- Pfennig, K.S. 1998. The evolution of mate choice and the potential for conflict between species and matequality recognition. *Proceedings of the Royal Society B* 265: 1743-1748.
- Pfennig, K.S. and Ryan, M.J. 2006. Reproductive character displacement generates reproductive isolation among conspecific populations: an artificial neural network study. *Proceedings of the Royal Society B*. 273: 1361-1368.
- Pisanets, E.M. 1978. O novom poliploidnom vide zab *Bufo danatensis* Pisanets sp. n. iz Turkmenii. *Doklady Akademii Nauk Ukrainskoi SSR, Serija B*. 3: 280-284.
- Poggio, L. y Naranjo, C.A. 2004. Citogenética. *En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds.). Ediciones INTA.
- Pombal Jr., J.P. and Haddad, C.F.B. 1992. Species in the *Phyllomedusa burmeisteri* group from eastern Brazil, with description of a new species (Amphibia, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 52: 217-229.
- Pough, F.H., Magnusson, W.E., Ryan, M.J., Wells, K.D. and Taigen, T.L. 1992. Behavioural energetics. *In: Environmental Physiology of the Amphibians*. Feder and Burggren, W.W. (Ed.). University Chicago Press. Chicago and London.
- Preston, B.T., Stevenson, I.R., Pemberton, J.M., Coltman, D.W. and Wilson, K. 2005. Male mate choice influences female promiscuity in Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 272: 365-373.
- Prestwich, K.N. 1994. The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *The American Zoologist* 34: 625-643.
- Prestwich, K.N., Brugger, K.E. and Topping, M. 1989. Energy and communication in three species of hylid frogs: power input, power output and efficiency. *Journal of Experimental Biology* 144: 53-80.

- Ptacek, M.B., Gerhardt, H.C. and Sage, R.D. 1994. Speciation by polyploidy in treefrogs: multiple origins of the tetraploid, *Hyla versicolor*. *Evolution* 48: 898-908.
- Ralin, D.B. 1977. Evolutionary aspects of mating call variation in a diploid-tetraploid species complex of treefrogs (Anura). *Evolution* 31: 721-736.
- Ramsey, J. and Schemske, D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 29: 467-501.
- Rand, A.S. 1988. An overview of anuran acoustic communication. In: *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. Frittsch, B., Ryan, M.J., Wilczynski, W., Hetherington, T.E. and Walkowiak, W. (Eds.), pp. 415-433. New York: J. Wiley.
- Ridley, M. 1983. *The Explanation of Organic Diversity: the Comparative Method and Adaptations for Mating*. Oxford: Clarendon Press.
- Riechert, S.E. and Johns, P.M. 2003. Do female spiders select heavier males for the genes for behavioral aggressiveness they offer their offspring? *Evolution* 57: 1367-1373.
- Roff, D.A. 1992. *The Evolution of Life Histories*. New York: Chapman & Hall.
- Rohlf, F.J. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 299-316.
- Roberts, J.D. 1997. Call evolution in *Neobatrachus* (Anura: Myobatrachidae): speculations on tetraploid origins. *Copeia* 1997: 791-801.
- Ron, S.R., Santos, J.C. and Cannatella, D.C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 392-403.
- Rose, G.J. and Brenowitz, E.A. 1997. Plasticity of aggressive thresholds in *Hyla regilla*: discrete accommodation to encounter calls. *Animal Behaviour* 53: 353-361.
- Rosset, S., Baldo, D., Lanzone, C. and Basso, N.G. 2006. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology* 40: 465-477.
- Rosset, S., Ferraro, D.P., Alcalde, L. and Basso, N.G. 2007. A revision of *Odontophrynus barrioi* (Anura: Neobatrachia): morphology, osteology, vocalizations, and geographic distribution. *South American Journal of Herpetology*, 2: 97-106.

- Rowe, L. and Arnqvist, G. 1996. Analysis of the causal components of assortative mating in water striders. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 38: 279-286.
- Ruiz, I.R.G. 1980. Heterocromatina constitutiva e organizadores nucleolares em anfíbios do genero *Odontophrynus*. Tese apresentada ao Instituto de Biociencias da Universidade de Sao Pablo: 143 pp.
- Ruiz, I.R.G. and Beçak, W. 1976. Further studies on polyploid amphibians V. C-banding in diploid and tetraploid species of *Odontophrynus*. *Chromosome* (Berlin) 54:69-74.
- Ruiz, I.R.G., Almeida, T.M.B. and Beçak, W. 1981. Active nucleolar-organizer regions in polyploid populations of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura) from South Brazil. *Genetica* 63: 31-37.
- Ryan, M.J. 1985. The Tungara Frog: A Study in Sexual Selection and Communication. Chicago: University of Chicago Press.
- Ryan, M.J. 1988. Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication. Offprints from the evolution of the amphibian auditory system. E.b.D.B. Fritzs. Chapter 28.
- Ryan, M.J. 1990. Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7: 157-195.
- Ryan, M.J. and Wilczynski, W. 1991. Evolution of intraspecific variation in the advertisement call of a cricket frog (*Acris crepitans*, Hylidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 44: 249-271.
- Ryan, M.J. and Rand, A.S. 1993. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* 47: 647-657.
- Ryan, J.M. and Getz, W.M. 2000. Signal decoding and receiver evolution: an analysis using neural networks. *Brain, Behavior, and Evolution* 56: 45-62.
- Ryan, M.J. and Rand, A.S. 2001. Feature weighting in signal recognition and discrimination by the túngara frog. In: Anuran Communication. Ryan, M.J. (Ed.), pp. 86-101. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Sáez, F.A. and Brum-Zorrilla, N. 1959. Citogenética de anfíbios anuros de América del Sur. Los cromosomas de *Odontophrynus americanus* y *Ceratophrys ornata*. *Anales de la Facultad de Medicina* (Montevideo) 44: 414-423.
- Sáez, F.A. and Brum-Zorrilla, N. 1966. Karyotype variation in some species of the

- genus *Odontophrynus* (Amphibia-Anura). *Caryologia* 19:55-63.
- Salas, N.E. 2004. Las especies del género *Odontophrynus* de la provincia de Córdoba, Argentina. Tesis Doctoral. Departamento de Cs. Naturales. Facultad de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto: 120 pp.
- Salas, N.E. 2006. Análisis cromosómico de *Odontophrynus americanus*, *O. achalensis*, *O. cordobae* y *O. occidentalis* (Anura, Leptodactylidae) de la provincia de Córdoba, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 20: 13-38.
- Salas, N.E. y di Tada, I.E. 1994. Análisis bioacústico del canto nupcial de *Odontophrynus occidentalis* y *Odontophrynus achalensis* (Anura: Leptodactylidae) en la Provincia de Córdoba. *Revista de la Universidad Nacional de Río Cuarto* 14: 55-63.
- Salas, N.E. and Martino, A.L. 2007. Cariotipo de *Odontophrynus cordobae* Martino & Sinsch, 2002 (Anura, Leptodactylidae). *Journal of basic and applied genetics* 18: 1-5.
- Salas, N.E. y Martino, A.L. 2008. Patrones de configuraciones meióticas en poblaciones de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* (Anura: Cycloramphidae), en el área central de Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics* 19 (2): 27-32
- Salas, N.E., Zavattieri, M.V., di Tada, I.E., Martino, A.L. and Bridarolli, M.E. 1998. Bioacustical and etho-ecological features in amphibian communities of southern Córdoba Province (Argentina). *Cuadernos de Herpetología* 12: 37-46.
- Salthe, S.N. 1965. Increase in volume of the perivitelline chamber during development of *Rana pipiens* Schreber. *Physiology and Zoology* 38: 80-98.
- Salthe, S.N. and Meham, J.S. 1974. Reproductive and courtship patterns. In: *Physiology of the Amphibia*, Vol. II. Lofts, B. (ed.), pp. 309-521. New York Academic Press.
- Savage, J.M. and Cei, J.M. 1965. A review of the Leptodactylid frog genus *Odontophrynus*. *Herpetologica* 21: 178-195.
- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in amphibian-. 1. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* (Berlin) 66: 361-388.

- Schmid, M., Haaf, T. and Schempp, W. 1985. Chromosome banding in Amphibia IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma* 91: 172-182.
- Schmidtke, J., Beçak, W. and Engel, W. 1976. The reduction of genic activity in the tetraploid amphibian *Odontophrynus americanus* is not due to loss of ribosomal DNA. *Experientia* 32: 27-28.
- Schröer, T. and Greven, H. 1998. Verbreitung, Populationsstrukturen und ploidiestadien von Wasserfröschen in Westfalen. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 5: 1-14.
- Schwartz, J.J. 1991: Why stop calling? A study of unison bout singing in a Neotropical treefrog. *Animal Behaviour* 42: 565-577.
- Schwartz, J.J., Ressel, S.J., Bevier, C.R. 1995. Carbohydrate and calling: depletion of muscle glycogen and chorusing dynamics of the neotropical treefrog *Hyla microcephala*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 37: 125-135.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia* 1979: 297-306.
- Shine, R., O'Connor, D., Lemaster, M.P. and Mason, R.T. 2001. Pick on someone your own size: ontogenetic shifts in mate choice by male garter snakes result in size assortative mating. *Animal Behaviour* 61: 1133-1141.
- Sinsch, U. and Schneider, H.. 1999. Taxonomic reassessment of Middle Eastern lake frogs: Morphological variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 37: 67-73.
- Sinsch, U., Salas, A.W. and Canales, V. 1995. Reassessment of central Peruvian Telmatobiine (genera *Batrachophrynus* and *Telmatobius*). Morphometry and classification. *Alytes* 13: 14-44.
- Small, J.V. and Davies, H.G. 1970. The haemoglobin in the condensed chromatin of mature amphibian erythrocytes: a further study. *Journal of Cell Science* 7: 15-33.
- Smith, H.M. 1925. Cell size and metabolic activity in Amphibia. *Biological Bulletin* 48: 347-378.
- Soltis, D.E. and Soltis, P.S. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 14(9): 348-352.
- Stöck, M. 1998. Mating call differences between diploid and tetraploid green toads

- (*Bufo viridis* complex) in Middle Asia. *Amphibia-Reptilia* 19: 29-42.
- Stöck, M. and Große, W.-R.. 1997. Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. *Alytes* 15(2): 72-90.
- Stöck, M., Schmid M., Steinlen C., Grosse, W-R. 1999. Mosaicism in somatic triploid specimens of the *Bufo viridis* complex in the Karakoram with examination of calls, morphology and taxonomic conclusions. *Italian Journal of Zoology* 66: 215-232.
- Straneck R., de Olmedo, E.V. y Carrizo, G.R. 1993. Catálogo de Voces de Anfibios Argentinos. Parte 1. Editorial L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina, 131 pp.
- Streelman, J.T. and Danley, P.D. 2003. The stages of vertebrate evolutionary radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 126-131.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. and Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786.
- Sullivan, B.K. and Wagner Jr, W.E. 1988. Variation in advertisement and release calls, and social influences on calling behavior in the gulf coast toad (*Bufo valliceps*). *Copeia* 1988: 1014-1020.
- Sullivan, B.K. and Malmos, K.B. 1994. Call variation in the Colorado river toad (*Bufo alvarius*): behavioral and phylogenetic implications. *Herpetologica* 50: 146-156.
- Szarski H. 1970. Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. *Nature* 226: 651-652.
- Szarski H. 1976. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *International Review of Cytology* 44: 93-111.
- Szarski, H. and Czopek, G. 1966. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences. Cl II. Sér Sci. Biol.* 14: 433-437.
- Taborsky, B., Guyer, L. and Taborsky, M. 2009. Size-assortative mating in the absence of mate choice. *Animal Behaviour* 77: 439-448.
- Taigen, T.L. and Wells, K.D. 1985. Energetics of vocalization by an anuran amphibian, *Hyla versicolor*. *The Journal of Comparative Physiology B* 155:163-170.
- Timowska, J. 1991. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. In: *Amphibian cytogenetics and evolution*. Green & Session (Ed.): 456 pp.

- Tinbergen, N. 1959. Comparative studies of the behavior of gulls (Laridae): a progress report. *Behaviour* 15: 1-70.
- Tooze, J. 1964. Measurements of some cellular changes during the fixation of amphibian erythrocytes with osmium tetroxide solutions. *The Journal of Cell Biology* 22: 551-563.
- Torrella, S.A y Adámoli, J. 2006. Situación ambiental de la ecorregion Chaco Seco. *En: La Situación Ambiental Argentina 2005*. Brown, A., Martínez Ortiz, U., Acerbi, M. y Corchera, J. (Eds.), pp 74-100. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- Valetti, J.A., Salas, N.E. and Martino, A.L. 2009: A new polyploid species of *Pleurodema* (Anura: Leiuperidae) from Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina and redescription of *Pleurodema kriegi* (Müller, 1926). *Zootaxa* 2073: 1-21.
- Vazquez, J.B., Miatello, R.A. y Roque, M.E. 1979. Geografía física de la Provincia de Córdoba. Editorial Boldt, Buenos Aires, 464 pp.
- Vitt, L.J. and Caldwell, J.P. 2009. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Third Edition. Burlington, Massachusetts, U.S.A.: Academic Press.
- Vreys, C. and Michiels, N. K. 1997. Flatworms flatten to size up each other. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 264: 1559-1564.
- Waage, J.K. 1979. Reproductive character displacement in Calopteryx (Odonata: Calopterygidae). *Evolution* 33: 104-116.
- Wasserman, A.O. 1970. Polyploidy in the common tree toad, *Hyla versicolor* Le Conte. *Science* 167: 385-386.
- Wells, K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behaviour*. 25:666-693.
- Wells, K.D., Taigen, T.L. and O'Brien, J.A. 1996. The effect of temperature on calling energetics of the spring peeper (*Pseudacris crucifer*). *Amphibia-Reptilia* 17:149-158.
- Wells, K.D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. Chicago, IL: University of Chicago Press. 1400 p.
- Wells, K.D. and Schwartz, J.J. 1984a. Vocal communication in a neotropical treefrog, *Hyla ebraccata*: advertisement calls. *Animal Behaviour* 34: 405-420.

- Wells, K.D. and Schwartz, J.J. 1984b. Vocal communication in a neotropical treefrog, *Hyla ebraccata*: aggressive calls. *Behaviour* 91: 128-145.
- Wells, K.D. and Taigen, T.L. 1989. Calling energetics of a neotropical frog, *Hyla microcephala*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 25: 13-22.
- Wells, K.D. and Taigen, T.L. 1992. The energetics of reproductive behavior. In: Environmental Physiology of the Amphibians. Feder, M.E. and Burggren, W.W. (Eds.), pp. 410-426. Chicago: University of Chicago Press.
- Wells, K.D. and Schwartz, J.J. 2007. The behavioral ecology of anuran communication. In: Hearing and Sound Communication in Amphibians. Vol. 28. Narins, P.M., Feng, A.S., Fay, R.R. and Popper, A.N. (Eds.), pp. 44-86. Springer; New York.
- West-Eberhardt, M.J. 1983. Sexual selection, social competition, and speciation. *The Quarterly Review of Biology* 58: 973-993.
- Whitman, C.O. 1899. Animal behaviour. In: Biological Lectures, Woods Hole. Whitman, C.O. (Ed.), pp. 285-338. Boston: Ginn.
- Wilczynski, W. and Ryan, M.J. 1999. Geographic variation in animal communication systems. In: Geographic Variation in Behavior: Perspectives on Evolutionary Mechanisms. Foster, S. A. and Endler, J. A., (Eds.), pp. 234-261. Oxford University Press, USA,
- Wiley, R.H. 1994. Errors, exaggeration, and deception in animal communication. In: Behavioral mechanisms in ecology. Real, L. (Ed.), Chapter 7, pp. 157-189. University of Chicago Press, Chicago.
- Wong, B.B.M., Cowling, A.N.N., Cunningham, R.B., Donnelly, C.F. and Cooper, P.D. 2004. Do temperature and social environment interact to affect call rate in frogs (*Crinia signifera*)? *Austral Ecology* 29: 209-214.
- Woolbright, L.L. 1983. Sexual selection and size dimorphism in anuran amphibians. *The American Naturalist* 121: 110-119.
- Wynn, A. and Heyer, W.R. 2001. Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider 1799) (Anura Leptodactylidae) *Tropical Zoology* 14: 255-285.
- Zavala Gallo, L.M. 2007. Comportamiento reproductivo y desarrollo embrionario y larval de la especie *Odontophrynus cordobae* Martino & Sinsch, 2002 (Anura:

- Leptodactylidae). Tesis de Grado. Departamento de Cs. Naturales. Facultad de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto: 77.
- Zweifel, R.G. 1968. Effects of temperature, body size, and hybridization on mating calls of toads, *Bufo americanus* and *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* 1968:269-85.

ANEXO I

A continuación se anexan los trabajos publicados durante el desarrollo de la Tesis de doctorado, relacionados con el tema abordado y las especies consideradas en el presente estudio:

- ✓ Grenat, P.R., C. Bionda, N.E. Salas & A.L. Martino (2009). Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*. *Amphibia-Reptilia*, 30: 141-145. Leiden, Netherlands.
- ✓ Grenat, P.R.; N.E. Salas, & A.L. Martino (2009). Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa*, 2049: 67-68. Auckland, New Zealand.
- ✓ Grenat, P.R., Zavala Gallo, L.M., Salas, N.E. & A.L. Martino (2009). The tadpole of *Odontophrynus cordobae* Martino & Sinsch, 2002 (Anura, Cycloramphidae) from Central Argentina. *Zootaxa*, 2161: 47-59. Auckland, New Zealand.
- ✓ Grenat, P.R., Zavala Gallo, L.M., Salas, N.E. & A.L. Martino (2011). Embryonic and larval stages in development of *Odontophrynus cordobae* (Anura, Cycloramphidae). *Biologia*, 66(6): 1148-1158. Bratislava, Slovakia.
- ✓ Grenat, P.R., Zavala Gallo, L.M., Salas, N.E. & A.L. Martino (2012). Reproductive behaviour and development dynamics of *Odontophrynus cordobae* (Anura, Cycloramphidae). En prensa. *Journal of Natural History*. Oxford, United Kingdom.
- ✓ Grenat, P.R.; N.E. Salas, & A.L. Martino (2012). Estudio de la variación morfológica intra e interespecífica entre poblaciones de *Odontophrynus* (Amphibia, Anura) del área central de Argentina. En prensa. *Revista de Biología Tropical*. San José, Costa Rica.

Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*

Pablo R. Grenat^{1,2}, Clarisa Bionda^{1,2}, Nancy E. Salas¹, Adolfo L. Martino^{1,*}

Abstract. Differences in erythrocyte size between tadpoles and adults have been found in numerous anuran species but there are no references about erythrocyte size of juveniles. We measured the size of red blood cells and nuclei of juvenile and adult individuals of *Odontophrynus americanus*. Erythrocyte and nuclear size of juvenile were significantly smaller than the corresponding sizes of adults. The erythrocytes of juvenile *O. americanus* were comparable in size to the erythrocytes of adult *O. cordobae*. We discuss about the possibility of correctly distinguishing juvenile *O. americanus* (tetraploid) from adult *O. cordobae* (cryptic diploid counterpart) specimens using erythrocytes. We also discuss possible causes of variation.

Keywords: diploid, erythrocyte, erythrometry, *Odontophrynus*, polyploidy, red blood cells, tetraploid.

Most hematological studies of anurans have been concerned with blood-cell counts (Fankhauser, 1945; Hutchison and Szarski, 1965; Rouf, 1969; Arıkan, 1989). Because blood cells of amphibians conserve their nucleus, the erythrocyte size is correlated with the DNA content (Uzzell, 1964; Beçak and Goissis, 1971; Olmo and Morescalchi, 1975, 1978; De Smet, 1981; Horner and MacGregor, 1983; Stöck and Grosse, 1997; Schröer and Greven, 1998; Cianciarullo, Soares and Beçak, 2000). Some investigators have even stressed that in amphibians, erythrocyte size may be used in ploidy determination (Stöck and Grosse, 1997; Schröer and Greven, 1998; Martino and Sinsch, 2002; Rosset et al., 2006). For this reason, erythrometry is a technique used for the distinction of related species with different ploidy levels (Stöck and Grosse, 1997; Schröer and Greven, 1998; Stöck et al., 1999; Martino and Sinsch, 2002; Rosset et al., 2006). Morphological differences between larval and adult red blood cell have been

noted in numerous species of anurans. During metamorphosis, larger larval red blood cells are replaced by smaller adult erythrocytes (Broyles, 1981; Duellman and Trueb, 1986), but there are no references about juvenile erythrocyte size. The genus *Odontophrynus* includes two cryptic species with different ploidy levels: *Odontophrynus cordobae* ($2n = 22$) and *O. americanus* ($4n = 44$). Exomorphologic aspects do not distinguish the two taxa. Differences in advertisement call and erythrocyte size between *O. americanus* and *O. cordobae* adults were used to distinguish the two species (Martino and Sinsch, 2002; Rosset et al., 2006). Juveniles are often found in breeding places. Because the two species are morphologically similar and juveniles do not call, we wondered if erythrometry is effective in the distinction of these species when juvenile *O. americanus* individuals are analyzed. The present paper evaluates differences in the size of the red blood cells and nuclei between juvenile and adult individuals of *O. americanus*.

We analyzed 8 juvenile individuals of *O. americanus* from a rural zone of Río Cuarto city ($33^{\circ}08'S$, $64^{\circ}22'W$) and 10 adult males of *O. americanus* (callers) from this site and nearby localities. The tail had been completely reabsorbed in all juveniles. We also analyzed 10 adult males of *O. cordobae*: 6 from El Cano ($32^{\circ}37'S$, $64^{\circ}35'W$) and 4 from Río de los Sauces ($32^{\circ}32'S$, $64^{\circ}36'W$).

The blood sample was obtained by angularis vein puncture (Nöller, 1959). Smears of fresh blood were air-dried

1 - Ecología-Educación Ambiental, Departamento de Ciencias Naturales; Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales; Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional N° 36-km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Córdoba, Argentine

2 - CONICET

*Corresponding author; e-mails:

amartino@exa.unrc.edu.ar; adolfomartino@gmail.com

Table 1. Mean and standard deviation values of erythrocyte measurements ($n = 40$) of 8 juvenile and 10 adult *Odontophrynus americanus*, and 10 adult *O. cordobae*.

Individual	Cell			Nuclear			N/C ratio
	Length (μm^2)	Width (μm^2)	Area (μm^2)	Length (μm^2)	Width (μm^2)	Area (μm^2)	
<i>O. americanus</i>	18.69	12.74	187.69	7.05	4.31	23.84	0.127
Juveniles	(± 1.14)	(± 0.73)	(± 17.79)	(± 0.84)	(± 0.48)	(± 3.67)	
<i>O. americanus</i>	21.59	14.97	253.99	7.76	4.51	27.37	0.101
Adults	(± 0.65)	(± 0.54)	(± 14.25)	(± 0.46)	(± 0.34)	(± 2.22)	
<i>O. cordobae</i>	18.52	12.78	186.03	6.29	3.68	18.14	0.096
Adults	(± 0.52)	(± 0.31)	(± 4.64)	(± 0.37)	(± 0.24)	(± 1.23)	

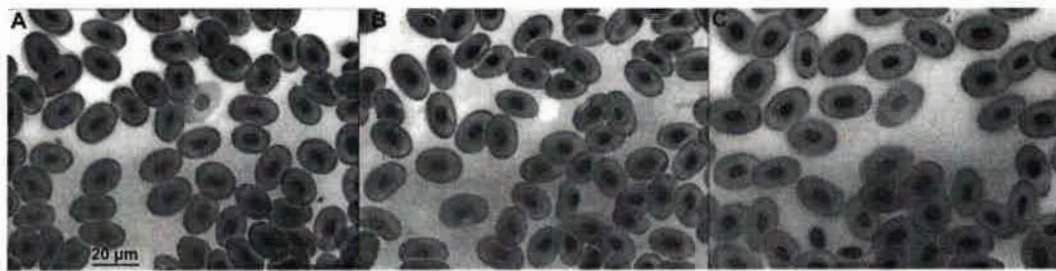


Figure 1. Erythrocyte size of diploid *Odontophrynus cordobae* individuals (A) and tetraploid *O. americanus* juveniles (B) and adults (C).

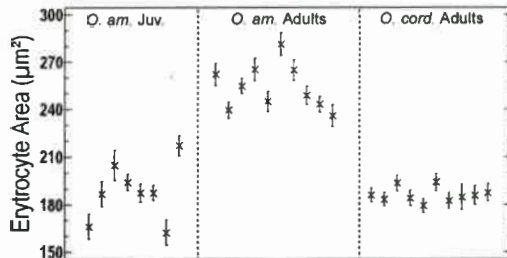


Figure 2. Comparison of erythrocyte area (μm^2) of *Odontophrynus americanus* (juveniles and adults) and *O. cordobae* (adults). The exes indicate average size and the vertical lines represent the 95% confidence intervals.

and stained with a 10% solution of Giemsa for 5 min. We measured the major and minor axes of forty randomly chosen erythrocytes and their respective nuclei for each individual. Measurements were carried out using a light microscope at magnification of 1000 \times and the image processing software AxioVision 4.1. Photographs were obtained by using an Axiophot Microscope (Carl Zeiss) with Cannon Powershot G6 Digital Camera and ZoomBrowser EX. Cell and nuclear areas were calculated assuming an ellipsoid shape ($A*B*\pi/4$, where A and B were the major and minor axes of erythrocytes and nuclei, respectively).

Mean values and standard deviations of all measured variables taken from erythrocytes are

given in table 1. Cells and nuclei areas of juvenile *O. americanus* were smaller than cells and nuclei of adult *O. americanus*. The average erythrocyte areas of juveniles varied between 162.42 and 215.59 μm^2 , whereas the average cell areas in adults varied between 235.92 and 280.31 μm^2 (figs 1 and 2, table 1). Differences in the juvenile and adult red blood size were highly significant (ANOVA, $F_{1,718} = 1193.87$; $P < 0.0001$). A second order polynomial model describes the relationship between average cell area and snout-vent length (SVL). The equation of the fitted model is: average erythrocyte area = $-222.133 + 20.9743*SVL - 0.230642*SVL^2$ ($R^2 = 86.06\%$; ANOVA, $F_{2,15} = 46.31$; $P < 0.0001$) (fig. 3). Tetraploid juveniles and adults also showed significant differences in nuclear area (ANOVA, $F_{1,718} = 94.36$; $P < 0.0001$). Nuclear area from *O. americanus* adults was larger than that of juveniles (fig. 4). Just as for the cell area, a second order polynomial regression indicated a significant relationship between

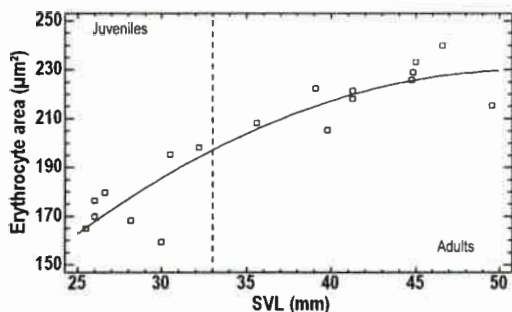


Figure 3. Polynomial regression of second order describing the relationship between erythrocyte area and snout-vent length of juvenile and adult individuals of *Odontophrynus americanus* ($R^2 = 85.89\%$).

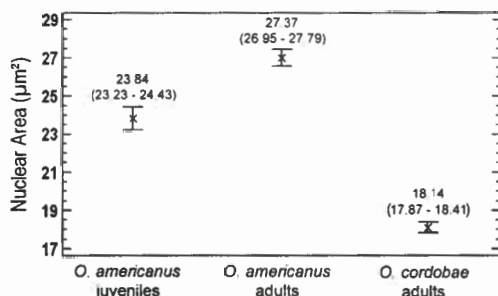


Figure 4. Comparison of nuclear area (μm^2) of *Odontophrynus americanus* (juveniles and adults) and *O. cordobae* (adults). The exes indicate average size and the vertical lines represent the 95% confidence intervals.

nuclear area and SVL. The equation of the fitted model is: average nuclear area = $-20.6455 + 2.33793 \cdot \text{SVL} - 0.0279051 \cdot \text{SVL}^2$ ($R^2 = 57.96\%$; ANOVA, $F_{2,15} = 10.34$; $P < 0.005$).

On the other hand, nuclear area of *O. americanus* juveniles was significantly larger than nuclear area of *O. cordobae* adults (ANOVA, $F_{1,718} = 327.86$; $P < 0.0001$) although not in cell area (ANOVA, $F_{1,718} = 1.20$; $P = 0.2729$). An approximate nuclear/cell area ratio of 0.127 was found in *O. americanus* juveniles, whereas this ratio was 0.101 in tetraploid adults (similar to *O. cordobae* adults = 0.096).

There is high variability in cell and nuclear size of erythrocytes in the same specimen and some juveniles and adults show overlapping values. We considered that the mean values obtained from forty erythrocytes measurement are a correct estimation of the individual ery-

throcyte variables. Erythrocyte size measured for juveniles of *O. americanus* (tetraploids) are thus within or near to the ranges for *O. cordobae* (diploids) and most values are rather different from the minimum erythrocyte area found for *O. americanus* adults (tetraploid) (table 1). Nuclear size from tetraploid juveniles was, however, significantly larger than in diploid adults. This is an important point because several studies carried out on pairs or groups of diploid/polyploid species use cell and not nuclear size to differentiate them (e.g. Stöck and Grosse, 1997; Stöck et al., 1999; Martino and Sinsch, 2002; Christiansen et al., 2005).

The circulating red blood cells of pre- and prometamorphic tadpoles contain larval type hemoglobin (Hb), whereas erythrocytes of post-metamorphic froglets and adults contain adult type Hb. At the beginning of the metamorphic climax, new red blood cells containing adult type Hb appear, and two types of erythrocytes coexist in the systemic circulation until the cells containing larval type Hb disappear at the end of the metamorphic climax (Dorn and Broyles, 1982). Although it has not been established that these changes in Hb type represent replacement of the erythrocyte populations, it is possible that cells with larval Hb are removed from the systemic circulation by an apoptotic process (Hasebe, Kawamura and Kikuyama, 1996). In view of the SVL of the juveniles we analyzed, we believe that total replacement of larval by adult (or at least post-larval) erythrocytes had occurred, but studies about haemoglobin type would be required to demonstrate this. The shape of cells of the juveniles studied was uniform and similar to adult erythrocytes (fig. 1), suggesting that no admixture of larval and postlarval erythrocytes was present. Benbassat (1974) observed a sharp increase in haemoglobin synthesis during the metamorphic climax in *Rana catesbeiana*. In this species the circulating cells of tadpoles at this stage of metamorphosis produce mainly frog haemoglobin and relatively small amounts of tadpole haemoglobin. A later stage consists

in the gradual decline in haemoglobin production by the erythrocytes in the course of the maturation of the juvenile (Benbassat, 1974). Thus, differences in red blood cell size between juveniles and adults could result from the concentration of hemoglobin in cell. Small and Davies (1970), suggested that in several amphibians the condensed chromatin in mature nucleated erythrocytes is surrounded by nuclear haemoglobin at a concentration approximately equal to that in the cytoplasm. If this association in haemoglobin concentration between cytoplasm and nucleus occurs, this could explain the differences in nuclear size between juveniles and adults of *O. americanus*. Differences found in nuclear area between *O. americanus* juveniles and adults were minor compared to differences in cell area, although these differences were significant.

Since the erythrocyte is the most important carrier of oxygen and carbon dioxide, its surface area to volume ratio is a determining factor in the exchange of these gases with the tissues. A small cell offers the possibility of a greater rate of exchange than a larger one (Hartman and Lessler, 1964). There is considerable variation in the hemoglobin content per unit volume of blood obtained from different specimens (Tooze, 1964). Several authors have noted an inverse relationship between metabolic rate and cell size (Smith, 1925; Szarski, 1970, 1976; Gregory, 2002, 2003). Small cells enable rapid conversion of surplus energy to offspring tissues under food excess, and large cells enable long fasting and some offspring production even under moderate food availability (Kozłowski, Konarzewski and Gawelczyk, 2003). Moreover, an inverse correlation between cell size and cell number in amphibians and other vertebrates has been recognized (Smith, 1925), such that these differences among cells may be further exaggerated when observed at the organism level (Gregory, 2003).

In conclusion, juveniles and adults of *O. americanus* were significantly different in both cell and nuclear size. Our results show that

a correct distinction between *O. cordobae* and *O. americanus* specimens is not possible using juvenile erythrocytes of tetraploid individuals when only cell size is considered. Further studies about haemoglobin type and content would be required to analyze the causes of erythrocyte size variation during the ontogeny of *O. americanus* individuals. Furthermore, it would be important determine whether this variation is related to metabolic rate at different development stage.

Acknowledgements. The first two authors thank the National Scientific and Technical Research Council (CONICET) for support. The Secretary of Science and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18C/225. Our study was authorized by Cordoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.). T. Uzzell and an anonymous referee made helpful comments on an earlier version of the manuscript.

References

- Arkan, H. (1989): Investigation on the blood cell counts of *Rana ridibunda* (Anura: *Ranidae*) populations in Anatolia. *Doga TU Zool. D.* **13**: 54-59 (in Turkish).
- Beçak, W., Goissis, G. (1971): DNA and RNA content in diploid and tetraploid amphibians. *Cell. Mol. Life Sci.* **27**: 345-346.
- Benbassat, J. (1974): The transition from tadpole to frog hemoglobin during natural amphibian metamorphosis. *J. Cell Sci.* **15**: 347-357.
- Broyles, R.H. (1981): Changes in the blood during amphibian metamorphosis. In: *Metamorphosis. A Problem in Developmental Biology*, 2nd Edition, p. 461-490. Gilbert L.I., Frieden, E., Eds, New York, Plenum Press.
- Christiansen, D.G., Fog, K., Pedersen, B.V., Boomsma, J.J. (2005): Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark. *Evolution* **59**: 1348-1361.
- Cianciarullo, A.M., Soares, M.J., Beçak, W. (2000): Erythropoiesis in the diploid and tetraploid *Odontophrynus americanus*: an evolutionary approach in these cryptic species (Amphibia, Anura, *Leptodactylidae*). *Comp. Haemat. Int.* **10**: 19-29.
- De Smet, W.H.O. (1981): The nuclear Feulgen-DNA content of the vertebrates (especially reptiles), as measured by fluorescence cytophotometry, with notes on the cell and chromosome size. *Acta Zool. Pathol. Antverp.* **76**: 119-167.
- Dorn, A.R., Broyles, R.H. (1982): Erythrocyte differentiation during the metamorphic hemoglobin switch of *Rana catesbeiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5592-5596.

- Duellman, W.E., Trueb, L. (1986): *Biology of Amphibians*. New York, McGraw Hill Publishing Company.
- Fankhauser, G. (1945): The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Quart. Rev. Biol.* **20**: 20-78.
- Gregory, T.R. (2002): A bird's-eye view of the C-value enigma: genome size, cell size, and metabolic rate in the class Aves. *Evolution* **56**: 121-130.
- Gregory, T.R. (2003): Variation across amphibian species in the size of the nuclear genome supports a pluralistic, hierarchical approach to the C-value enigma. *Biol. J. Linn. Soc.* **79**: 329-339.
- Hartman, F.A., Lessler, M.A. (1964): Erythrocyte measurements in fishes, amphibians and reptiles. *Biol. Bull.* **126**: 83-88.
- Hasebe, T., Kawamura, K., Kikuyama, S. (1996): Genomic DNA fragmentation in red blood cells of the bullfrog during metamorphosis. *Devel. Growth Differ.* **38**: 605-615.
- Horner, H.A., Macgregor, H.C. (1983): C-value and cell volume: their significance in the evolution and development of amphibians. *J. Cell Sci.* **63**: 135-146.
- Hutchison, H.V., Szarski, H. (1965): Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles. *Copeia* **1965**: 373-375.
- Kozłowski, J., Konarzewski, M., Gawelczyk, A.T. (2003): Cell size as a link between noncoding DNA and metabolic rate scaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 14080-14085.
- Martino, A.L., Sinsc, U. (2002): Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *J. Zool. Lond.* **257**: 67-81.
- Nöller, H.G. (1959): Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflügers Arch. Physiol.* **269**: 98-100.
- Olmo, E., Morescalchi, A. (1975): Evolution of the genome and cell sizes in salamanders. *Experientia* **31**: 804-806.
- Olmo, E., Morescalchi, A. (1978): Genome and cell size in frogs: a comparison with salamanders. *Experientia* **34**: 44-46.
- Rosset, S., Baldo, D., Lanzone, C., Basso, N.G. (2006): Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: *Leptodactylidae*). *J. Herp.* **40**: 465-477.
- Rouf, M.A. (1969): Hematology of the leopard frog, *Rana pipiens*. *Copeia* **1969**: 682-687.
- Schröer, T., Greven, H. (1998): Verbreitung, Populationsstrukturen und ploidieregrade von Wasserfröschen in Westfalen. *Z. Feldherpetol.* **5**: 1-14.
- Small, J.V., Davies, H.G. (1970): The haemoglobin in the condensed chromatin of mature amphibian erythrocytes: a further study. *J. Cell Sci.* **7**: 15-33.
- Smith, H.M. (1925): Cell size and metabolic activity in Amphibia. *Biol. Bull.* **48**: 347-378.
- Stöck, M., Grosse, W.R. (1997): Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. *Alytes* **15**: 72-90.
- Stöck, M., Schmid, M., Steinlen, C., Grosse, W.-R. (1999): Mosaicism in somatic triploid specimens of the *Bufo viridis* complex in the Karakoram with examination of calls, morphology and taxonomic conclusions. *Ital. J. Zool.* **66**: 215-232.
- Szarski, H. (1970): Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. *Nature* **226**: 651-652.
- Szarski, H. (1976): Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* **44**: 93-111.
- Tooze, J. (1964): Measurements of some cellular changes during the fixation of amphibian erythrocytes with osmium tetroxide solutions. *J. Cell Biol.* **22**: 551-563.
- Uzzell, T. (1964): Relations of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex (Amphibia, Caudata). *Copeia* **1964**: 257-300.

Received: March 7, 2008. Accepted: October 3, 2008.



Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae)

GRENAT, P.^{1, 2} SALAS, N. E.¹ & MARTINO, A. L.^{1, 3}

¹Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina. E-mail: nsalas@exa.unrc.edu.ar

²CONICET. E-mail: pgrenat@exa.unrc.edu.ar

³Corresponding author. E-mail: amartino@exa.unrc.edu.ar,

External morphology and size do not allow a distinction between diploid *Odontophrynus cordobae* and tetraploid *O. americanus* (Beçak *et al.* 1967; Barrio and Pistol de Rubel 1972). In Córdoba province allopatric diploid populations are distributed to the NW and allopatric tetraploid populations to the SE. Sympatric populations would occur in the SW of the province. A diagnostic character should be found for a correct, simple and rapid distinction of the species without sacrificing individuals. Differences in erythrocyte size (ES) between diploid and tetraploid *Odontophrynus* were found (Rosset *et al.* 2006). Martino & Sinsch (2002) defined a range of erythrocyte area for *O. cordobae* and *O. americanus* but individuals were not cytogenetically studied. Rosset *et al.* (2006), showed cell areas from only 2 preserved museum specimens of *O. cordobae*.

We evaluated the efficiency of the erythrometry (EM) as character to identify live *O. cordobae* and *O. americanus*. We consider that it is necessary to establish typical ranges of cell area for each species starting from specimens previously karyotyped. We utilized a larger sample size and we analyzed allopatric and sympatric populations to examine the possibility of clinal variation within the state.

We analyzed 46 individuals from 12 localities of Córdoba and San Luis. We assumed that all individuals have adult cells because they showed an SVL > 35mm (Grenat *et al.* 2009). We measured the ES of 26 *O. cordobae* and 20 *O. americanus* adult specimens previously karyotyped to determine the erythrocyte area range for each species (Table 1). We measured length (L) and Width (W) of 15 erythrocytes for each individual using a light microscope (1000 X). Erythrocyte area was calculated assuming an ellipsoid shape ($L*W*\pi/4$). Differences among the analyzed species were tested using ANOVA. We used the coefficient of variation ($CV=(SD/Mean)*100$) to compare patterns of variation at different levels: within individual, between individuals from the same population and between populations from each species.

The average erythrocyte area of previously confirmed diploids was 159.32 μm^2 (range: 137.08–191.10 μm^2) while in tetraploids it was 230.82 μm^2 (209.11–258.55 μm^2). The average length and width were 17.01 and 11.91 μm for *O. cordobae* and 20.50 and 14.33 μm for *O. americanus*. Differences in cell area, length and width were highly significant ($P<0.0001$). Individual variation in erythrocyte area of *O. cordobae* (8.52%) was slightly higher than in *O. americanus* (7.84%). Intra-population variation in cell area was similar for the two species (5.23 and 5.70% respectively) while inter-population variation was higher in *O. cordobae* (7.03%) than in *O. americanus* (3.11%). However, comparison between cell area of allopatric and sympatric populations were not significant for none of the two species (*O. cordobae*: $P=0.6238$; *O. americanus*: $P=0.4199$). Width cell showed a higher inter-population variation than in length cell in both species. Cell width comparison between allopatric and sympatric *O. cordobae* was not significant ($P=0.1995$). Similar comparison between allopatric and sympatric *O. americanus* showed no differences in cell width ($P=0.1388$).

According with probability distributions, the values used for separate species would be 192.45 μm^2 (probability=99.83%), 18.79 μm (99.68%) and 13.06 μm (98.2%) for erythrocyte area, length and width respectively. In this study, it was possible to establish a cell size value that permitted to separate diploids and tetraploids of 12 localities of central region of Argentina using EM. Furthermore, syntopic *O. cordobae* and *O. americanus* individuals were easily recognized.

Martino and Sinsch (2002) reported a range with smaller minimal and maximal cell areas (189–233.5 μm^2) for *O. americanus*. Mean erythrocyte area, length and width obtained by Rosset *et al.* (2006) on 10 *O. americanus* (e.g., area: 120.6 μm^2) and 2 *O. cordobae* (e.g., area: 84.4 μm^2) were considerably smaller than those calculated in our study. This

difference is probably related to that these authors used preserved museum specimens.

The results obtained would indicate the importance and efficiency of erythrocyte size in amphibians as diagnostic character for the distinction of anuran cryptic species with different ploidy levels. The advantage of this method is that it is simple, rapid and minimally invasive. Blood samples can be obtained by angularis vein puncture without sacrificing specimens (Nöller 1959). Erythrometry contrary to cytogenetics is a method that does not require the sacrifice of the individuals and represents a powerful tool with a high level of accuracy for resolve the problem of distinguishing living *O. cordobae* and *O. americanus*.

TABLE 1. Mean and standard deviation of measurements of erythrocytes of karyotyped individuals of diploid *Odontophrynus cordobae* and tetraploid *O. americanus*. *n* = number of individuals studied. A = allopatric; S: sympatric.

Locality	n	Ploidy	Length (μm)	Width (μm)	Area (μm^2)
Las Rosas (A)	3	Diploid	17.02 (\pm 0.76)	11.13 (\pm 0.43)	148.93 (\pm 12.38)
Rodeo Viejo (A)	3	Diploid	17.01 (\pm 1.01)	11.74 (\pm 0.50)	156.86 (\pm 5.7)
Río de los Sauces (A)	2	Diploid	18.18 (\pm 0.44)	12.63 (\pm 0.74)	180.53 (\pm 14.95)
Elena (A)	1	Diploid	15.53	11.6	141.63
A° San Francisco (S)	3	Diploid	16.89 (\pm 0.27)	11.55 (\pm 0.27)	153.36 (\pm 5.69)
Camino W (S)	8	Diploid	16.8 (\pm 0.34)	12.01 (\pm 0.5)	158.61 (\pm 9.13)
El Cano (S)	1	Diploid	16.71	12.22	160.42
La Escondida (S)	5	Diploid	17.29 (\pm 0.32)	12.26 (\pm 0.09)	166.6 (\pm 2.78)
Los Membrillos (A)	3	Tetraploid	20.3 (\pm 0.61)	13.75 (\pm 0.26)	219.5 (\pm 10.35)
Sampacho (A)	2	Tetraploid	21.1 (\pm 0.36)	14.32 (\pm 0.87)	237.22 (\pm 10.21)
Baigorria (S)	3	Tetraploid	20.29 (\pm 0.62)	14.33 (\pm 0.35)	228.41 (\pm 10.91)
Gigena (S)	3	Tetraploid	20.49 (\pm 0.22)	13.99 (\pm 0.9)	225.17 (\pm 17.07)
El Cano (S)	3	Tetraploid	20.86 (\pm 1.28)	14.37 (\pm 0.4)	235.91 (\pm 20.38)
La Escondida (S)	6	Tetraploid	20.33 (\pm 0.43)	14.76 (\pm 0.51)	235.82 (\pm 9.9)

Acknowledgements

The first author thanks the Argentinean National Research Council for Science and Technology (CONICET). We thank J. Valetti, M. Baraquet, G. Repezza and E. Castellino for their help in the field and for providing specimens. The Secretary Research and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18/C288.

References

- Barrio, A. & Pistol de Rubel, D. (1972) Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de *Odontophrynus americanus*; (Anura, Leptodactylidae) relacionada con otros rasgos taxonómicos. *Physis*, 31, 281–291.
- Beçak, W., Beçak, M.L., Lavalle, D. & Schreiber, G. (1967) Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae) II. DNA content and nuclear volume. *Chromosoma*, 23, 14–23.
- Grenat, P.R., Bionda, C., Salas, N.E. and Martino, A.L. (2009) Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*. *Amphibia-Reptilia*, 30, 141–145.
- Martino, A.L. & Sinsch, U. (2002) Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *Journal of Zoology* (London), 257, 67–81.
- Nöller, H.G. (1959). Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflüger's Archives of Physiology*, 269, 98–100.
- Rosset, S., Baldo, D., Lanzone, C. & Basso, N.G. (2006) Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 40, 465–477.
- Schmid, M. (1978) Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma (Berl.)*, 66, 361–388.

The tadpole of *Odontophrynus cordobae* Martino & Sinsch, 2002 (Anura: Cycloramphidae) from central Argentina

PABLO R. GRENAT^{1,2}, LUCIO M. ZAVALA GALLO¹, NANCY E. SALAS¹ & ADOLFO L. MARTINO^{1,3}

¹ Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina. E-mails: pgrenat@exa.unrc.edu.ar, luciozavalagallo@yahoo.com.ar, nsalas@exa.unrc.edu.ar, amartino@exa.unrc.edu.ar

² CONICET Fellowships

³ Corresponding author. E-mail: amartino@exa.unrc.edu.ar, adolfomartino@gmail.com

The genus *Odontophrynus* is endemic to South America and currently consists of 10 recognized species distributed in southern and eastern of the continent (Rosset *et al.* 2006; Rosset 2008; Amaro *et al.* 2009). The *americanus* group is currently represented by four species: *O. americanus*, *O. lavillai*, *O. cordobae* and *O. maisuma*. *Odontophrynus cordobae* is cryptic with their polyploid counterpart *O. americanus* and inhabited in the center and northwestern Córdoba and south of Santiago del Estero provinces (Martino and Sinsch 2002; Rosset *et al.* 2006). The tadpole of *O. cordobae* remains undescribed. Herein we describe the larval external morphology and oral disc.

Amplexic pairs of *O. cordobae* were collected in a stream near to Santa Rosa de Calamuchita, Córdoba province (32°02'S; 64°36'W; 674 m elevation), in October 2002. In this site its cryptic counterpart *O. americanus* is not present. Each pair was kept in plastic recipients to obtain complete clutches. *Odontophrynus* species deposited their eggs singly and sink to the bottom of the streams and temporary ponds (Martino & Sinsch 2002; Martino A.L. comm. pers.). Description was based on 10 tadpoles at stage 37 (Gosner 1960) obtained after rearing clutches in the laboratory and fixed in 10% formalin. Morphometric measurements were taken on all specimens using a Zeiss SR stereomicroscope with a micrometer to nearest 0.1 mm (Table 1). Terminology and measurements follows Schiesari (1996) and Altig & McDiarmid (1999) and additionally we defined two new variables Tail epiaxial musculature height and Tail hypaxial musculature height. Specimens were deposited in the herpetological collection of Fundación Miguel Lillo (FML), Tucumán, Argentina.

TABLE 1. Morphometric measurement (mm) for 10 tadpoles of *Odontophrynus cordobae*.

Character	Mean/SD	Minimum	Maximum
Total length	40.1 (± 4.2)	35.9	50.9
Tail length	22.1 (± 2.1)	20.2	27.1
Maximum tail height	8.4 (± 1.0)	7.5	11.0
Upper fin height	3.0 (± 0.3)	2.7	3.6
Lower fin height	2.3 (± 0.3)	2.0	2.9
Tail epiaxial musculature height	2.6 (± 0.4)	2.2	3.7
Tail hypaxial musculature height	2.1 (± 0.4)	1.8	3.1
Maximum body height	10.2 (± 1.3)	9.2	13.5
Interocular distance	5.4 (± 0.5)	4.9	6.6
Internarial distance	1.8 (± 0.1)	1.6	2.1
Eye-nares distance	3.0 (± 0.2)	2.8	3.6
Eye diameter	2.1 (± 0.3)	1.9	2.6
Rostronarial distance	2.4 (± 0.2)	2.2	2.9
Nostril-eye distance	5.2 (± 0.4)	4.8	6.2
Oral disc width	4.1 (± 0.4)	3.9	5.3

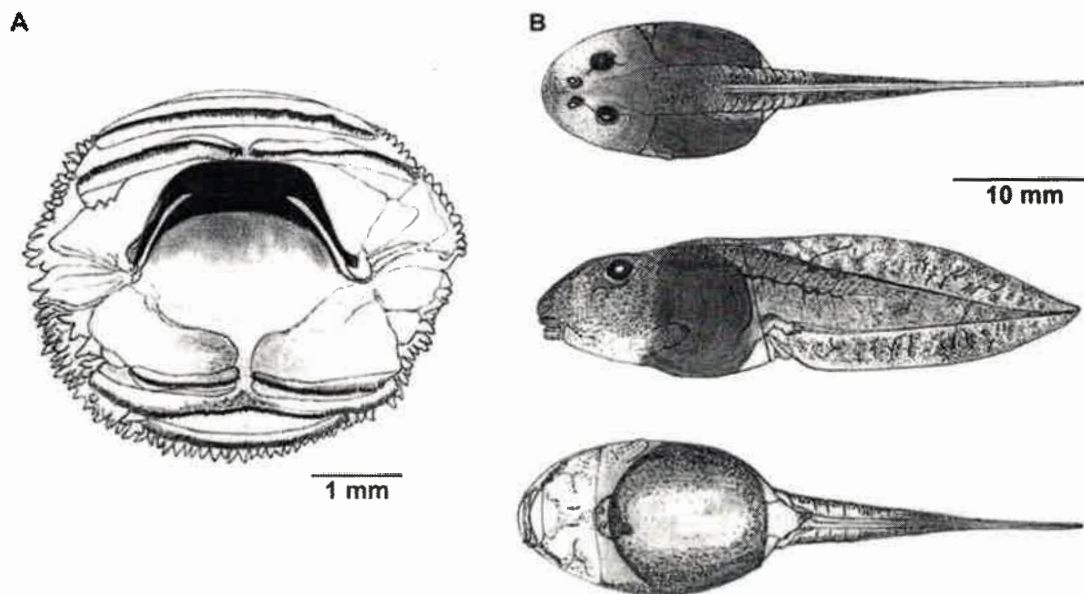


FIGURE 1. Tadpole of *Odontophrynus cordobae* (FML 23426); A) Oral disc; B) Dorsal, lateral and ventral view of the tadpole.

Description of tadpoles: Body ovoid in dorsal view and gently depressed in lateral view (Fig. 1). Maximum width is at the middle of the body. Maximum height is at the middle of the tail. Tail approximately $\frac{1}{2}$ of total length. Tail length 2.6 times tail height. Dorsal fin (DF) is slightly higher than ventral fin (VF) ($DF/VF=1.29\pm 0.05$). Caudal musculature is robust narrowing gradually until tail tip. Snout is broadly rounded in dorsal and ventral view. In lateral view, the end of the snout is abrupt and rounded. Eyes are small, well separated, directed dorsolaterally, and are visible in dorsal and lateral view. Internal border of the nares slightly elevated. The external nares are about half between the eyes and the tip of the snout; narial openings are elliptical and located dorsally. Internarial distance $\frac{1}{3}$ of interocular distance. Spiracle tube is sinistral, simple and short. Spiracular opening is positioned medially and ventrally. Vent tube starts in the mid-posterior region of the abdomen and it is attached to ventral fin, opening dextrally.

Oral disc: The oral disc is subterminal and laterally emarginate (Fig. 1). It has a single row of marginal conical papillae surrounding the oral disc. A single large rostral gap is present; mental gap absent. Single or paired submarginal papillae are present in the supra- and infraangular zone, more common in the last. Extramarginal papillae rarely present (supraangular zone). Labial teeth single, with one cusp. The tooth row formula is 2(2)/3(1). Jaw sheaths keratinized and serrated; upper jaw sheath slightly square-shaped; lower jaw sheath arch-shaped with a shallow central V-cut.

Color in life: Dorsum of body is light brown with dark and irregular spots on the supraocular region, in the nasal camera and on origin of the tail. Nares margin is whitish. Laterally the coloration lightens toward the middle and ventral zone of the body. Ventral region is whitish. In dorsal view, tail musculature shows a dark central band that crosses the tail until distal portion. Laterally, the tail is light brown with irregular brown spots projecting toward the fins and with a black horizontal line between epi- and hypaxial musculature on the first third of the tail.

Color in preservative: The body is brown. Abdominal region is darker than rest of body. Nasal camera dark. Venter is transparent. Tail musculature is pale with grouped chromatophores forming a dense reticulate. Dorsal fin well pigmented with darker border.

Habitat: Typical habitat is represented by hill and foothill streams, although occasionally were found in ponds not associated to the streams. Generally, the tadpoles develop in zones of slow flow or dammed areas of streams between semi-submerged vegetation and dense algae formations.

The tadpole of *O. cordobae* presents several features in common with other tadpoles of the genus *Odontophrynus*, with small variations characteristic of each species: tooth row formula type 2/3; depressed-globular body; a single row of conical marginal papillae with a wide rostral gap; dorsal nares; spiracle opening sinistral (Savage & Cei 1965; Caramaschi 1979; Cei 1980; Cei & Crespo 1982; di Tada *et al.* 1984; Brandão & Batista 2000). The tadpole of *O. cordobae* shows some differences with respect to other described tadpoles of the *americanus* group. *O. lavillai* presents 2

constrictions on each side on the oral disc (angular and infraangular) (Lavilla & Scrocchi 1991). The tadpoles of *O. americanus* (70-75 mm) and *O. lavillai* (55.8 mm) are larger than of *O. cordobae* (maximum length=50.9 mm) (Gallardo 1963; Cei, 1980; Lavilla & Scrocchi 1991). Tail length/total length in *O. cordobae* ($\approx 55\%$) is lower than in *O. americanus* ($\approx 62\%$) and *O. lavillai* (62%) tadpoles (Gallardo 1963; Lavilla & Scrocchi 1991). Other feature that distinguishes *O. cordobae* from *O. americanus* tadpoles may be related to habitat: the former occur almost exclusively in streams or streamlets, whereas the second occur in ponds (Martino & Sinsch 2002). The tadpole of recently described *O. maisuma* (Rosset 2008) remains unknown.

Acknowledgements

We thanks to anonymous reviewer and Miguel Vences for their useful comments and suggestions on the manuscript. The Secretary Research and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18/C225. The first author thanks CONICET – Argentina (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) for postgraduate fellowship granted.

References

- Amaro, R.C., Pavan, D. & Trefaut Rodrigues, M. (2009) On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim & Caramaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). *Zootaxa*, 2071, 61–68.
- Altig, R. & McDiarmid, R.W. (1999) Body plan. Development and morphology. In: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (Eds.), *Tadpoles. The Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press. Chicago, pp. 24–51.
- Brandão, R.A. & Batista, C.G. (2000) Descrição do Girino de *Odontophrynus salvatori* (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia*, 89, 165–170.
- Caramaschi, U. (1979) O girino de *Odontophrynus carvalhoi* Savage & Cei, 1965 (Amphibia, Anura, Ceratophryidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 39, 169–171.
- Cei, J.M. (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano* (N.S.). Monog. N° 2
- Cei, J.M. & Crespo, E.G. (1982) Differences in larval morphology of allopatric isolated populations of the *Odontophrynus occidentalis* group from Western Argentina. *Arquivos do Museu Bocage, Serie A*, 1(14), 335–340.
- Di Tada, I.E., Barla, M.J., Martori, R.A. & Cei, J.M. (1984) *Odontophrynus achalensis* una nueva especie de anfibio de la Pampa de Achala (Córdoba, Argentina). *Historia Natural (Corrientes)*, 4(17), 149–155.
- Gallardo, J.M. (1963) Observaciones biológicas sobre *Odontophrynus americanus* (D. et B.) 1841. *Ciencia e Investigación*, 19(6), 177–186.
- Gosner, K.L. (1960) A simplified table for staging Anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183–190.
- Lavilla, E.O. & Scrocchi, G.J. (1991) Aportes a la herpetología del Chaco Argentino. II – Nuevos datos sobre *Odontophrynus lavillai* Cei, 1985 (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica Lilloana*, 40(1), 33–37.
- Martino, A.L. & Sinsch, U. (2002) Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *Journal of Zoology* (London), 257, 67–81.
- Rosset, S. (2008) New Species of *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken 1862 (Anura: Neobatrachia) from Brazil and Uruguay. *Journal of Herpetology*, 42(1), 134–144
- Rosset, S., Baldo, D., Lanzone, C. & Basso, N.G. (2006) Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 40(4), 465–477.
- Savage, J.M. & Cei, J.M. (1965) A review of the leptodactylid frog genus, *Odontophrynus*. *Herpetologica*, 21(3), 178–195.
- Schiesari, L.C., Grillitsch B. & Vogl, C. (1996) Comparative morphology of phytotelmonous and pond-dwelling larvae of four neotropical treefrog species (Anura, Hylidae, *Osteocephalus oophagus*, *Phrynohyas resinifictrix*, *Phrynohyas venulosa*). *Alytes* 13, 109–139.

External changes in embryonic and larval development of *Odontophrynus cordobae* Martino et Sinsch, 2002 (Anura: Cycloramphidae)

Pablo R. GRENAT, Lucio M. ZAVALA GALLO, Nancy E. SALAS & Adolfo L. MARTINO*

Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina; e-mail: adolfomartino@gmail.com

Abstract: We provide the first description of development for a species belonging to *Odontophrynus* genus by describing all external changes of embryonic and larval stages for *Odontophrynus cordobae*. External morphological changes through development were analyzed on specimens bred in captivity. Embryonic and larval development, from fertilization to metamorphosis, was completed in 62 days and 46 stages were defined. We split the staging series into ten developmental groups: fertilization (stages 1 and 2); segmentation (stages 3–9); gastrulation (stages 10–12); neurulation (stages 13–16); elongation (stages 17–19); external gill larva (stages 20–24); internal gill larva (stage 25); pre-metamorphosis (stages 26–41); pro-metamorphosis (stage 42); metamorphic climax (stages 43–46). Marked increases in total length were evidenced during elongation and during stage 25, when the tadpole begins to feed. Stage 25 was the longest one (8 days) and it was related to organs rearrangement, morphological progression and body mass increment typical of free life larval form. Similar studies on related species are needed to compare different developmental stages at different taxonomic levels.

Key words: *Odontophrynus*; tadpole; metamorphosis; developmental staging

Introduction

The complex life cycle of most amphibians, particularly frogs, allows the larval and adult stages to occupy entirely different ecological settings, providing a unique situation among tetrapods (McDiarmid & Altig 1999). During the larval period, anurans exhibit a series of dramatic morphological changes (Shimizu & Ota 2003). The continuously changing appearance of embryos and larvae during ontogenesis necessitates a method to quantify the progress of that development (Dünker et al. 2000). Staging is the recognition of certain morphological landmarks that appear useful to compare the sequence of events in a developmental continuum (McDiarmid & Altig 1999). Tables and some aspects of development stages describing the morphological changes during embryonic and larval period have been proposed for a few anuran species [e.g., general – Gosner (1960); *Rana pipiens* (Schreber, 1782) – Shumway (1940); Taylor & Kollros (1946); *Bufo valliceps* (Wiegmann, 1833) – Limbaugh & Volpe (1957); *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) – Nieuwkoop & Faber (1967); *Hyla japonica* Günther, 1859 – Iwasawa & Futagami (1992); *Microhyla ornata* (Duméril et Bibron, 1841) – Shimizu & Ota (2003); *Incilius aucoinae* (O’Neill et Mendelson, 2004) – Segura-Solis &

Bolaños (2009)], but most of them are incomplete and consider the description of only some stages. The use of a staging system allows comparisons among tadpoles of different size and developmental period that belong to diverse species having similar developmental steps (Gosner 1960). However, such developmental descriptions are not yet available for several major groups of anurans (Shimizu & Ota 2003).

The genus *Odontophrynus* is endemic to southern and eastern South America and consists of 10 recognized species so far (Rosset et al. 2006; Rosset 2008; Amaro et al. 2009). *Odontophrynus* species are clustered in four groups based on external morphology: *americanus*, *cultripipes*, *moratoi*, and *occidentalis* (Savage & Cei 1965; Cei 1987; Caramaschi 1996; Rosset 2008). The *americanus* group is represented by four species: *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron, 1841), *O. lavillai* Cei, 1985, *O. cordobae* Martino et Sinsch, 2002 and *O. maisuma* Rosset, 2008. The recently described *Odontophrynus cordobae* is cryptic with its polyploid counterpart, *O. americanus*, and it is found in central and northwestern Córdoba and southern Santiago del Estero and northwestern provinces (Martino & Sinsch 2002; Rosset et al. 2006).

Larvae of all *Odontophrynus* species have been described in advanced stages of development [*O. cultripipes*

* Corresponding author

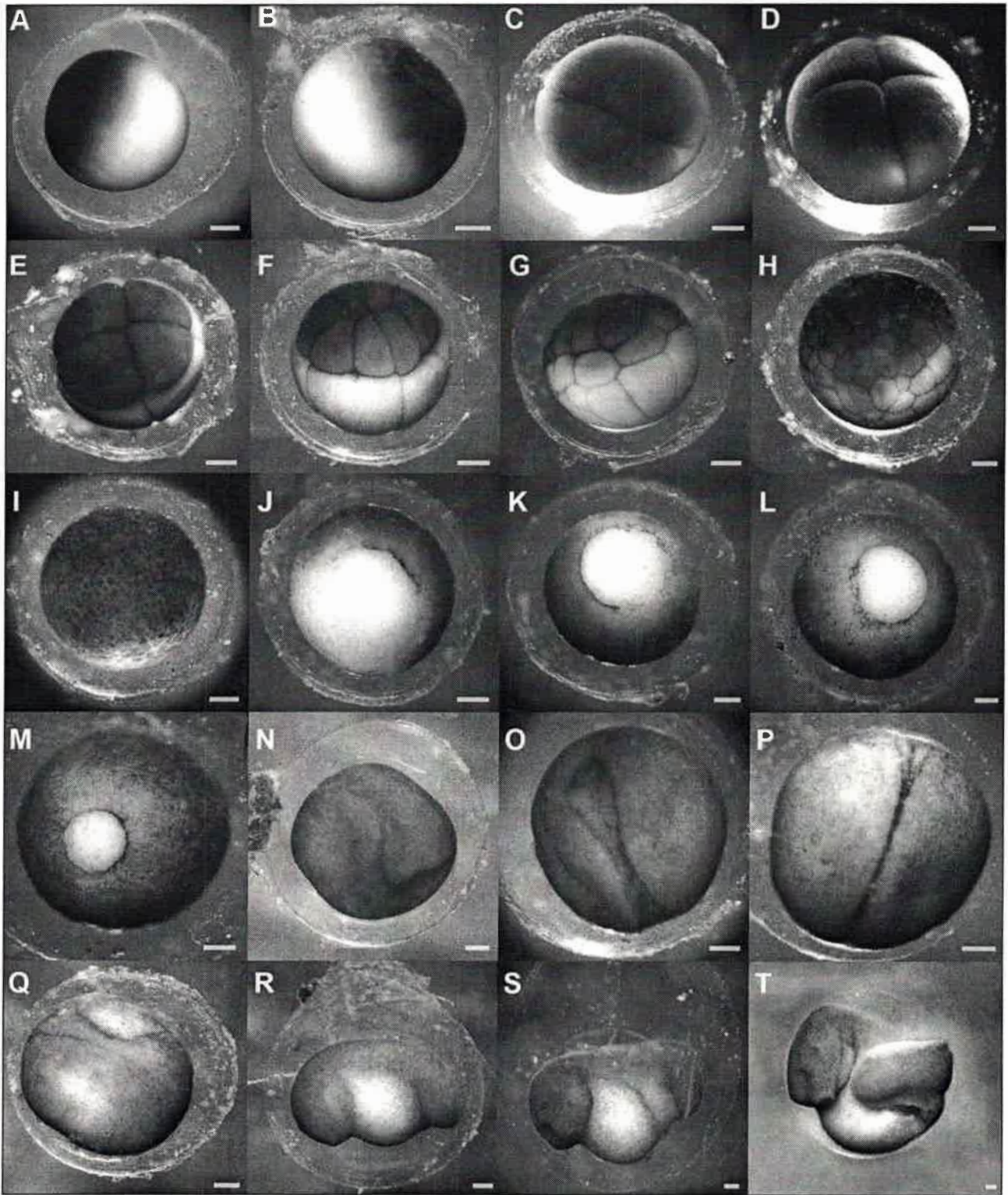


Fig. 1. Stages 1-19 of *O. cordobae*. A-B: Fertilization; C-I: Segmentation; J-M: Gastrulation; N-Q: Neurulation; S-U: Elongation. Scales 0.2 mm.

Reinhardt et Lütken, 1862 – Savage & Cei (1965); Cei (1980); *O. barrioi* Cei et al., 1982 – Cei et al. (1982); *O. salvatori* Caramaschi, 1996 – Brandão & Batista (2000); *O. occidentalis* (Berg, 1896) – Savage & Cei (1965); Cei (1980); Cei & Crespo (1982); *O. achalensis* di Tada et al., 1984 – di Tada et al. (1984); *O. carvalhoi* Savage et Cei, 1965 – Caramaschi (1979); *O. lavillai* – Lavilla & Scrocchi (1991); *O. americanus* – Gallardo (1963); Sav-

age & Cei (1965); Cei (1980); *O. cordobae* – Grenat et al. (2009); *O. maisuma* – Borteiro et al. (2010)]. However, at present, there are no studies on the complete embryonic and larval development for the genus *Odontophrynus*. In fact, only the complete development of *Rhinoderma darwini* Duméril et Bibron, 1841 was described (Jorquera et al. 1972) within the Cycloramphidae family.

Table 1. Description of embryonic stages ($n = 10$) for *Odontophrynus cordobae*: Fertilized egg and segmentation. TL (mm) = Total length (Mean, standard deviation and range).

St. N° (Gosner 1960)	Stage definition	Average Time (h:min)	Description
1	Fertilized egg	0	TL = 0.97 ± 0.03 (0.92–1.04); Dark brown animal hemisphere (upper) and light brown vegetal hemisphere. Slight depression on the surface of the animal hemisphere (indication of sperm entry).
2	Appearance of gray crescent	0:10	TL = 1.03 ± 0.03 (0.98–1.06); Rotation completed. Large area of the animal hemisphere invaded by the yolk that almost reaches the point of penetration. Rugosities on the surface of the animal pole.
3	2-cell	0:15	TL = 1.13 ± 0.04 (1.08–1.20); First cleavage (meridional) resulting in two blastomeres of equal size. Small folds on the surface of the zygote and the yolk membrane.
4	4-cell	0:35	TL = 1.15 ± 0.04 (1.10–1.24); Second cleavage (meridional) perpendicular to the first. The embryo is composed of four identical and well-defined blastomeres.
5	8-cell	1:10	TL = 1.15 ± 0.05 (1.04–1.22); Third cleavage (latitudinal). The embryo consists of eight unequal blastomeres: the smallest upper four (micromeres) represent the entire animal hemisphere and the largest lower four (macromeres) represent the entire vegetal hemisphere.
6	16-cell	1:20	TL = 1.13 ± 0.03 (1.12–1.14); Fourth cleavage (meridional). Cells of vegetal hemisphere delay completing their division due to the presence of yolk.
7	32-cell	1:30	TL = 1.17 ± 0.05 (1.08–1.24); Fifth cleavage (latitudinal).
8	Mid cleavage	2:10	TL = 1.18 ± 0.02 (1.16–1.22); 64 blastomeres. Animal and vegetal hemispheres are more evenly distributed. Early morula.
9	Late cleavage	3:05	TL = 1.15 ± 0.06 (1.02–1.24); Late morula. The embryo is formed by more than 64 blastomeres, increasingly smaller.

Research on anatomy and development of the larvae can provide valuable insights into systematics and functional diversification in closely related anurans' taxa (Vera Candiotti et al. 2011). These types of studies are essential to many researches involved with frog life-history materials and teratogenicity tests in toxicological studies.

Moreover, complete tables of development are necessary for accurate comparison of developmental stages in different organisms (Sayim & Kaya 2008). In order to increase our knowledge about the natural history of *O. cordobae* we describe the external morphological aspects of all embryonic and larval stages in detail to facilitate future comparisons within genus and family, and more broadly, with other amphibians.

Material and methods

Two pairs of *O. cordobae* in amplexus were collected during breeding season in a stream near Santa Rosa de Calamuchita (32°02' S; 64°36' W; 674 m a.s.l.), Cordoba province, Argentina. In this site, *O. americanus*, its cryptic counterpart is not present. Each pair was kept in plastic containers to obtain complete clutches. Embryos and young tadpoles were reared in plastic bowls of 20 cm diameter and 8 cm depth in average (laboratory temperature: $23 \pm 1^\circ\text{C}$), with natural ambient lighting, in de-chlorinated and gently aerated tap water. The water was exchanged once a day. The tadpoles were fed daily with boiled vegetables ad libitum. Embryonic and larval developmental stages were defined following Gosner (1960). Ten individuals of each stage were randomly sampled and preserved in formalin 4–10% in order to obtain a series comprising all developmental stages. The time lapses were counted since fertilization and were represented by the start of the stage. The embryonic period encompasses the early stages until hatching. After hatching, it is considered

that the development begins its larval stage, which leads to metamorphosis.

Terminology and measurements followed Altig & McDiarmid (1999). Total length (TL) and tail length (TaL) measurements were taken on all specimens using a caliper Somet Inox Extra and a Zeiss SR stereomicroscope with a micrometer to nearest 0.1 mm. All measurements, photographs and drawings were based on preserved animals. Descriptions were based on both preserved and live specimens. Photographs and drawings were performed by A. Martino and L. Zavala, respectively. Examined tadpole lot was deposited in the herpetology collection of Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina (FML 24190).

Embryonic and larval stages are described in Tables 1–5 to facilitate comparisons. Stages were separated into groups: fertilization (Table 1, Fig. 1); segmentation (Table 1, Fig. 1); gastrulation (Table 2, Fig. 1); neurulation (Table 2, Fig. 1); elongation (Table 2, Fig. 1); external gill larva (Table 3, Fig. 2); internal gill larva (Table 3, Fig. 2); pre-metamorphosis (Tables 4, 5, Fig. 3); pro-metamorphosis (Table 5, Fig. 4); metamorphic climax (Table 5, Fig. 4).

Results

Females deposited all eggs at once and disperse to the bottom of the containers. Fertilized egg diameter was 1.32 ± 0.05 mm (range 1.28–1.43 mm) (Fig. 1A). Embryonic and larval development, from fertilization to metamorphosis, was completed in 62 days and 46 stages were recognized following Gosner (1960) (Tables 1–5).

The variation in total length (TL) through embryonic and larval stages is shown in Tables 1–5. From stage 1 (fertilization egg) to stage 12 (late gastrula) (Figs 1A–M; Tables 1, 2), TL was fairly constant. Accentuated increases in TL were evident during the elongation period (stages 17–19) (Table 2, Figs 1S–U) and

Table 2. Description of embryonic stages ($n = 10$) for *Odontophrynus cordobae*: Gastrulation, Neurulation and Elongation. TL (mm) = Total length (Mean, standard deviation and range).

St. N° (Gosner 1960)	Stage definition	Average Time (h:min)	Description
10	Dorsal lip	5:05	TL = 1.17 ± 0.02 (1.14–1.18); Appearance of blastoporic lip at the boundary between the two hemispheres. The vegetal pole is quite reduced but it still has larger cells than the animal pole. Animal hemisphere continues to expand.
11	Mid-gastrula	7:20	TL = 1.16 ± 0.05 (1.04–1.22); Blastopore groove expands to form a ring that completely separates the embryo's pigmented from non pigmented portion. It is reduced later because blastoporic ring migrates to vegetal pole while yolk tissue invaginates into blastocoel (simultaneous emboly/epiboly).
12	Late-gastrula	8:15	TL = 1.15 ± 0.02 (1.12–1.18); Blastoporic lip is completely formed. Embryo coloration is light brown and its constitutive cells become indistinguishable. Yolk plug becomes smaller.
13	Neural plate	14:00	TL = 1.28 ± 0.02 (1.22–1.29); Yolk plug is invisible. Neural plate appearance. Slight flattening in dorsal embryo region. Embryo rotation begins at the end of stage.
14	Neural folds	15:10	TL = 1.38 ± 0.04 (1.31–1.43); Neural folds are elevated from the margin of the neural plate. These folds define a central neural groove, which closes and deepens as they grow. Embryo rotation is accelerated.
15	Rotation	17:25	TL = 1.37 ± 0.04 (1.33–1.43); Neural folds grow and are dorsomedially contact each other. The groove is bounded to a small dorsal slit in which the blastoporal cleft is included.
16	Neural tube	18:05	TL = 1.40 ± 0.04 (1.31–1.47); Neural tube is complete. The walls of the tube protrude considerably from the back and differ from the rest of the embryo by its dark brown color. Digestion of the yolk membrane and embryo elongation begins.
17	Tail bud	19:45	TL = 1.76 ± 0.08 (1.65–1.88); The rear end of the neural tube develops to form the tail bud. Head is well-distinguished. The adhesive organs begin to develop and the outline of future nares appears.
18	Muscular response	22:55	TL = 2.91 ± 0.23 (2.51–3.24); Tail bud is elongated. The outline of tail fins appears. Head continues to develop and stomodium cavity appears. Somites are marked. Muscular response to mechanical stimulation begins to be perceived.
19	Heart beat	33:00	TL = 3.79 ± 0.13 (3.59–3.92); Hatching occurs (36:15 h). Stomodium deepens. The primary external gills begin to develop: the upper is simple and the lower biarmed. Heart beat is visible as a pulsation below and behind the gills. Tail fins are differentiated. Outlines of nares and adhesive organs become more conspicuous.

Table 3. Description of larval stages ($n = 10$) for *Odontophrynus cordobae*: External and Internal gill larvae. TL (mm) = Total length (Mean, standard deviation and range).

St. N° (Gosner 1960)	Stage definition	Average Time (h:min)	Description
20	Gill circulation	40:45	TL = 4.28 ± 0.18 (4.00–4.65); Gill branching intensifies and blood circulation becomes visible. Head is extended and away from the yolk sac. The mouth cleft deepens and it is placed in a ventral position.
21	Cornea transparent	51:45	TL = 4.56 ± 0.27 (4.22–5.09); Ocular outline is evident. Nares and mouth deepens. Two pairs of external gills: the upper pair irregularly bilobed and the lower pair irregularly tri- or tetralobed. Heart beat is well-distinguishable. The upper border of the caudal musculature begins to darken. The boundary between muscle and caudal fins is well-defined.
22	Tail fin circulation	58:40	TL = 5.15 ± 0.26 (4.87–5.61); Caudal fin becomes transparent. Ocular structure is well-defined. Transparent larval epithelium appears. External gills reach maximum length. Snout becoming rounded. Somitic musculature is well defined. Opercular fold appears.
23	Operculum development I	63:45	TL = 5.46 ± 0.15 (5.27–5.67); Opercular fold progresses. Ocular globe is more defined (pupil well-defined). Transparent epithelium invaginates on nares position. Intestine begins to coil. Adhesive organs are less evident.
24	Operculum development II	70:58	TL = 6.12 ± 0.25 (5.65–6.40); Operculum right fold closes. Simultaneously, gills are absorbed. Opercular left fold development is delayed. Lateral marginal papillae appear. Adhesive organs disappear. Tail becomes more transparent with dark reticulated spots. Spiral coiling of the intestine becomes more pronounced. Body widens.
25	Operculum development III	85:40	h TL at beginning of stage = 6.76 ± 0.27 (6.30–7.30); TL at end of stage = 15.71 ± 1.00 (14.78–17.13); Opercular folds fuse, leaving only the opercular canal free. Spiracle tube is sinistral and spiracle opening at ventro-medial position. Upper and lower jaw sheaths are evident. Labial teeth appear (supraangular distal and infraangular medial row). Body extends laterally becoming ovoid. Tail fin is completely transparent. Spots of iridescent cells are evident behind each eye and below the base of tail fin.

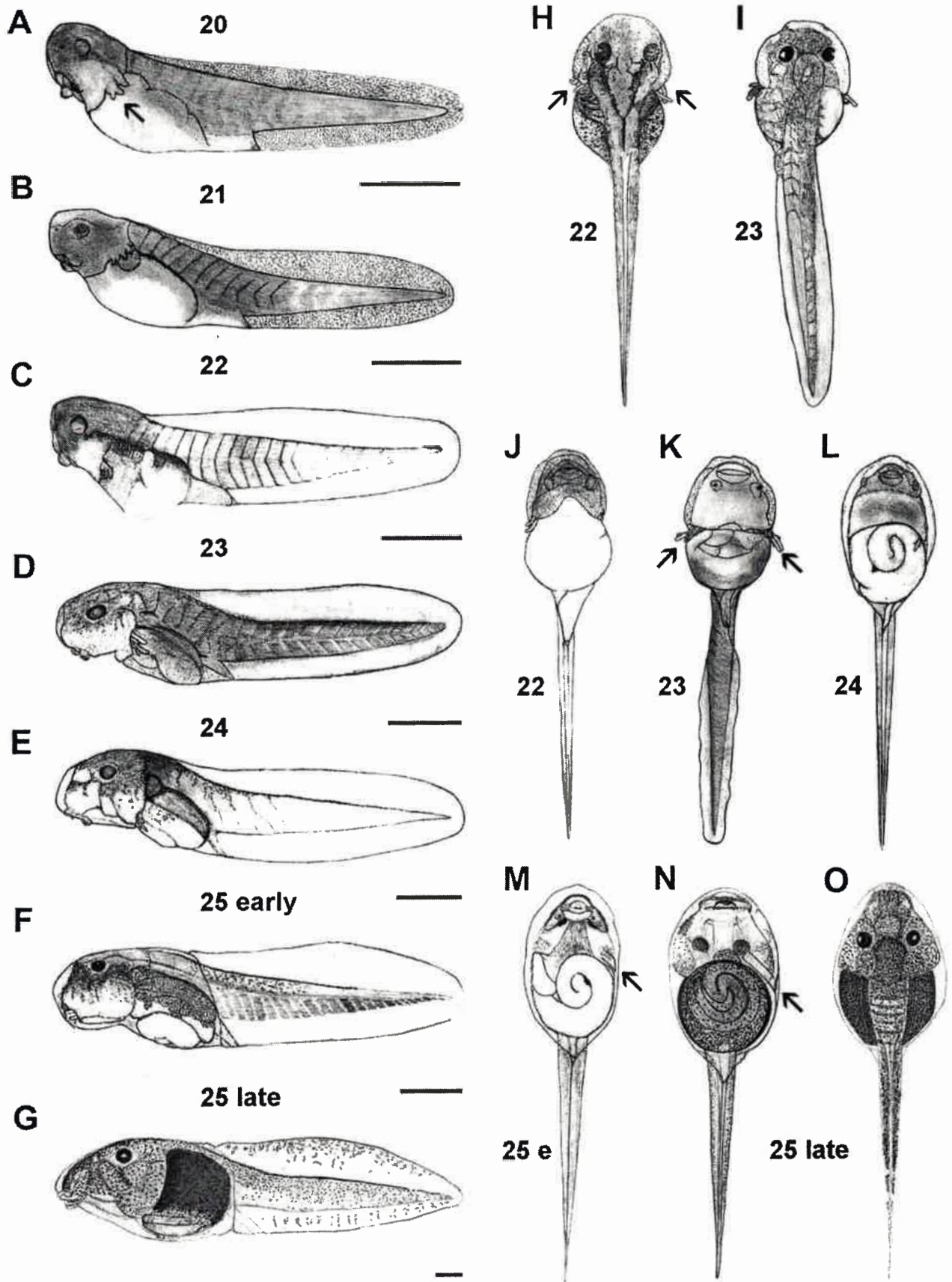


Fig. 2. Stages 20–25 of *O. cordobae*. External gill of tadpole: Lateral view: A: Stage 20; B: Stage 21; C: Stage 22; D: Stage 23; E: Stage 24, dorsal view; H: Stage 22; I: Stage 23, ventral view; J: Stage 22; K: Stage 23; L: Stage 24, arrows show changes in external gills. Stage 25, lateral view: early (F), late (G); ventral view: early (M), late (N); dorsal view (O), late, arrows show spiracle. Scales 1 mm.

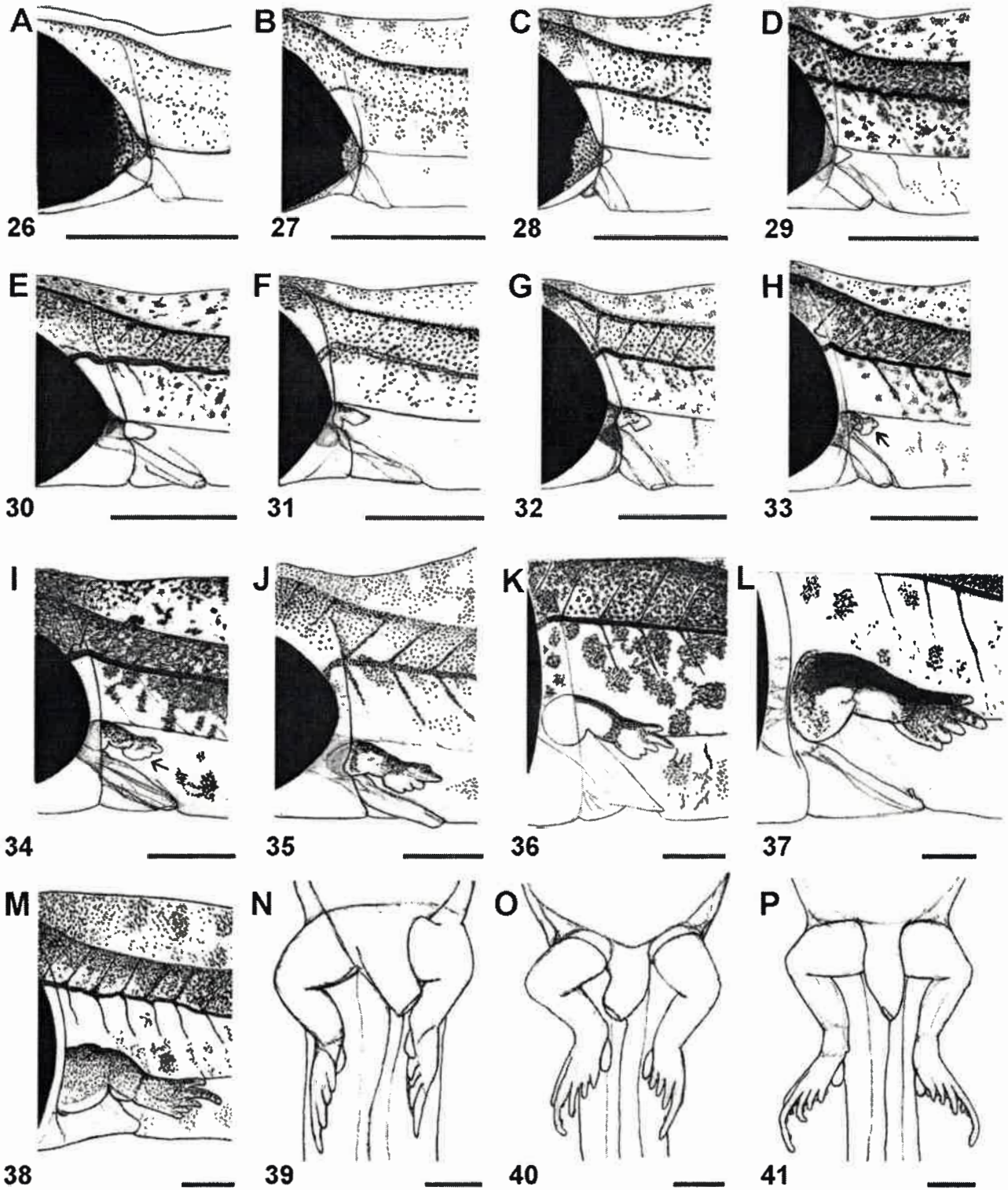


Fig. 3. Pre-metamorphosis of *O. cordobae*: A-E: Limb bud (stages 26-30); F-L: Toe development (stages 31-37), arrows show the appearance of indentations in toes differentiation; M: Appearance of metatarsal tubercle (stage 38); N: Subarticular tubercles appearing (stage 39); O-P: Disappearance of vent tube (stages 40-41). Scales 2.5 mm.

during stage 25 (when tadpole begins to feed) (Table 3, Figs 2F-G). From stage 26 to 41, TL increased gradually (Tables 4, 5). After reaching its peak, TL decreased rapidly until metamorphosis completion due to absorption of the tail (Table 5).

Tail length (TaL) represented 46% of total body length (TL) until stage 20 (hatching) (Fig. 2A), ranging between 50-56% for the rest of the larval stages. When reaching stage 43, TaL showed a sharp decrease of this ratio, which was close to 47% (Fig. 4B). In stage 44,

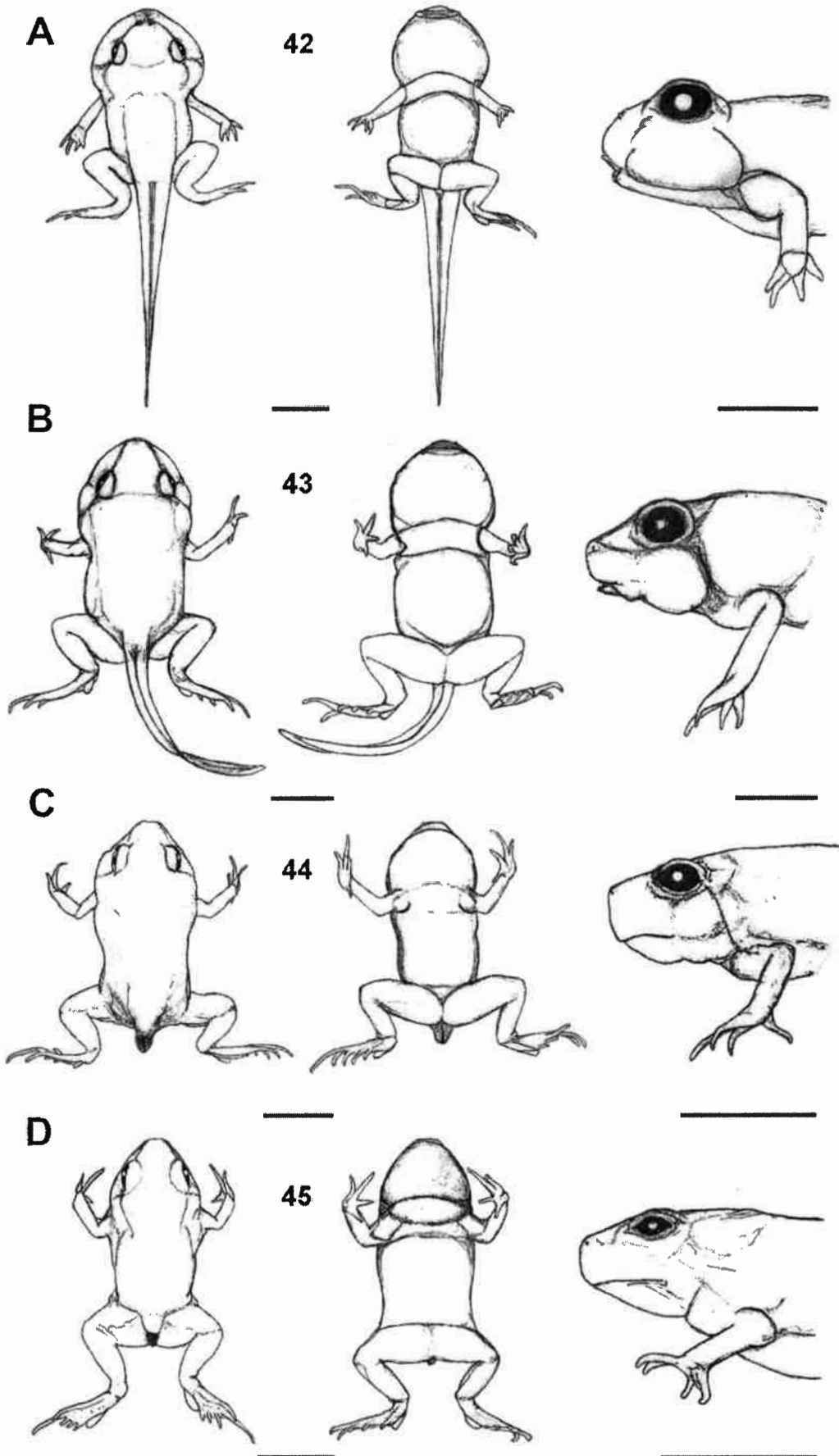


Fig. 4. Pro-metamorphosis of *O. cordobae*: A: Stage 42, dorsal, ventral and lateral view. Metamorphic climax: B: Stage 43, dorsal, ventral and lateral view; C: Stage 44, dorsal, ventral and lateral view; D: Stage 45, dorsal, ventral and lateral view. Scales 5 mm.

Table 4. Description of larval stages ($n = 10$) for *Odontophrynus cordobae*: Pre-metamorphosis: Limb bud and Toe development. TL (mm) = Total length (Mean, standard deviation and range).

St. N° (Gosner 1960)	Stage definition	Average Time (h:min)	Description
26	Limb bud I	11	TL = 16.28 ± 1.57 (14.45–19.13); Hind limb buds appear. Eyeball develops. Mouth is surrounded by a single row of interspersed conical papillae with a rostral gap evident along first labial teeth row and in each lateral constriction.
27	Limb bud II	12	TL = 18.39 ± 1.32 (16.00–20.00); Length of hind limb $> 0.5 \times$ basal width. Facial muscles are more visible.
28	Limb bud III	14	TL = 20.68 ± 1.29 (18.38–23.00); Length of hind limb \sim basal width.
29	Limb bud IV	15	TL = 21.96 ± 0.88 (20.38–23.63); Length of hind limb = $1.5 \times$ basal width. Limb bud shows a conical shape.
30	Limb bud V	17	TL = 24.09 ± 2.10 (21.75–28.05); Length of hind limb $\sim 2 \times$ basal width. Terminal portion of limb bud begins to widen obliquely and flatten, adopting an oar shape appearance. Knee junction is evident. The intensity of pigmentation increases, especially in the dorsal region of the body and caudal musculature.
31	Toe develop VI	19	TL = 24.43 ± 1.42 (22.88–27.05); Foot paddle increases in thickness and width. Pigmentation intensifies in dorsal region of hind limb by proliferation of chromatophores and iridescent cells (predominantly punctuate pattern). Foot paddle and lower portion of stylo-zeugopod are not pigmented.
32	Toe develop VII	22	TL = 27.23 ± 1.13 (24.88–28.80); autopod is distinguishable and non-pigmented.
33	Toe develop VIII	24	TL = 30.67 ± 1.84 (27.95–35.10); Foot paddle presents indentations indicating 5 th and 4 th toe differentiation. Limits among autopod, zeugopod and stylopod are well-defined.
34	Toe develop IX	26	TL = 32.62 ± 2.09 (30.20–37.50); Shallow indentations begin the differentiation of 1 st , 2 nd and 3 rd toe.
35	Toe develop X	30	TL = 34.40 ± 1.19 (32.80–36.05); Indentations deepen. 4 th and 5 th toes elongate.
36	Toe develop XI	34	TL = 37.19 ± 3.92 (31.25–44.20); Hind limb and toes elongate. 1 st and 2 nd toes remain joined. 3 th toe is released. Zeugo-autopod and zeugo-stylopod joints are evident. A rounded projection is distinguishable in the metatarsal region and gives rise to the metatarsal tubercle at successive stages.
37	Toe develop XII	38	TL = 40.06 ± 4.23 (35.90–50.90); Hind limbs and toes are elongated. 1 st and 2 nd toes are released. Lateral line system is well-distinguished on a dorsal part of body.

tail was reduced to a vestigial appendage representing 8% of the total length, and 4% in stage 45 (Fig. 4D). In the last stage the tail was completely absorbed.

Discussion

Comparative developmental biology has revealed that developmental mechanisms are often conserved throughout vertebrates (Raff 1996). Staged embryonic series are important as reference for different kinds of biological studies (Werneburg 2009).

Our observations of the type of clutch and the way in which females deposited eggs were consistent with other authors (Fernández & Fernández 1921; Gallardo 1963; Cei 1980; Cei & Crespo 1982; Barrio 1964; Martino & Sinsch 2002; Grenat et al. 2009).

Developmental times reported for some cycloramphids studied, such as the genus *Eusophus*, are relatively short (<90 days) (Vera Candiotti et al. 2005, 2011). Jorquera et al. (1974) reported a complete developmental period of 75 days for *Rhinoderma darwini*. Time of complete development for *O. cordobae* in our work was approximately two months. In nature, it has been observed that tadpoles complete their development between two and 13 months after oviposition, remaining as larvae throughout the winter

(Zavala Gallo, personal observation). This last development time is similar to that reported by Fernández & Fernández (1921) for *Odontophrynus* individuals from northern Córdoba (11–13 months), but considerably higher than that reported by Gallardo (1963) for *Odontophrynus americanus* individuals from Buenos Aires (7–8 months). However, Martino (1999) followed free-living clutches of *O. americanus* from southern Córdoba and observed that complete development occurred between 12–15 days, considerably less than the development time of *O. cordobae* under laboratory conditions. The differences detected in time periods and changes of developmental stages could be influenced by the environment in which clutches are located and evolve. Environmental heterogeneity poses a challenge to developing organisms, as habitat conditions and resource levels define growth and differentiation rates (Hentschel 1999; Dmitriew & Rowe 2005). Duellman & Trueb (1986) and Salthe & Mecham (1974) indicate that the temperature represents the most significant influence on developmental time and metamorphosis. In nature, temperature fluctuates daily and seasonally, and that may cause an increase in the duration of most stages and/or a decrease in others in comparison to observations made in laboratory with constant temperature (Niehaus et al. 2006). On the other hand, the water quality and

Table 5. Description of larval stages ($n = 10$) for *Odontophrynus cordobae*: Pre-metamorphosis (38–41), Pro-metamorphosis (42) and Metamorphic climax (43–46). TL (mm) = Total length (Mean, standard deviation and range).

St. N° (Gosner 1960)	Stage definition	Average Time (h:min)	Description
38	Metatarsal tubercle	42	TL = 41.46 ± 3.27 (37.50–47.00); Metatarsal tubercle reaches its final form. Joints are flexed. Curvature of 4 th toe is evident.
39	Subarticular tubercles	46	TL = 40.27 ± 4.66 (33.85–48.05); Subarticular tubercles appear. Forelimbs are visible inside gill chamber. Rotation of hind limbs begins.
40	Disappearance of vent tube I	50	TL = 42.22 ± 1.97 (39.15–46.20); Subarticular tubercles are distinguishable. Vent tube narrows and begins to be absorbed. Stylopods is positioned perpendicularly to the tail axis. Toe joints are evident. Typical warts on hind limbs appear.
41	Disappearance of vent tube II	53	TL = 42.55 ± 2.48 (37.85–45.30); Hind limb development is complete. Forelimbs elongate. Nares diameter is reduced. Lateral inclination of eyes is complete. Upper eyelid appears. Body dorsal portion begins to acquire the typical coloration pattern.
42	Disappearance of vent tube III	55	TL = 36.98 ± 2.55 (33.00–40.65); Forelimbs emerge. Upper eyelid is complete and lower eyelid appears. Snout shortens. Oral disc begins to be absorbed (first, labial teeth and folds then, jaw sheaths and finally papillae). Lateral ends of mouth reach their position beneath nares. Vent tube is completely absorbed. Reduction of the tail fin (the absorption of the tail begins). Skin glands appear on the back of the body.
43	Tail degenera- tion I	57	TL = 33.88 ± 5.04 (30.85–39.70); Oral disc is completely absorbed. Lateral ends of mouth do not reach eye level. Tail shortens and tail fins are reduced to vestiges. Development of dorsal skin glands intensifies.
44	Tail degenera- tion II	57	TL = 17.63 ± 1.93 (14.10–21.65); Snout shorten and becomes more angular. Mouth widens, reaching the level of pupils. Skin becomes rougher. Tail is reduced to a small dark appendage. Emergence.
45	Tail degenera- tion III	60	TL = 14.95 ± 1.40 (13.00–17.10); Mouth lateral ends reach their position beneath upper angle of eye. Openings of old gill chamber are completely sealed. Vocal sac is obscured.
46	Complete metamorphosis	62	TL = 14.39 ± 0.86 (12.90–15.55); Tail degeneration is complete.

permanence of reproductive water bodies could also influence development. If the aquatic environment begins to deteriorate, larvae can speed up maturation to the terrestrial phase and increase their chances of survival (Laurila & Kujasalo 1999; Merila et al. 2004; Morey & Reznick 2004). Clutches reared in artificial ponds, under normal environmental conditions, overwinter between stages 26–36. These stages are longer than those observed in laboratory conditions (Zavala Gallo, unpublished data).

Average egg diameter measured in the present work was slightly higher than that reported by Fernandez & Fernandez (1921) for *O. americanus* (1.2 mm). However, egg diameter reported for other species of the Cycloramphidae family are notably higher: *Rhinoderma darwinii* – 4 mm (Jorquera et al. 1974); *Eusophus emiliopugini* – 6.7–7.2 mm (Vera Candiotti et al. 2010).

The time of fertilization, which is complete with the formation of the gray crescent (Fig. 1B), took about 10 minutes in laboratory conditions. It is interesting to note that this fact differentiates *O. cordobae* from other leptodactyliforms in which the gray crescent does not appear during the development: *Pleurodema thaul* (Lesson, 1826) – Alay (1959), *P. brachyops* (Cope, 1869) – Leon-Ochoa & Donoso-Barros (1970) and *Batrachyla taeniata* (Girard, 1855) – Jorquera & Molinari (1979). In some amphibian species no gray crescent is seen because eggs are either too pigmented (*Bufo*) or not pigmented at all, e.g., *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) –

Brachet (1977). The duration of segmentation and gastrulation stages in *O. cordobae* was markedly shorter than that of *Rhinoderma darwinii* (92 hours – Jorquera et al. 1974).

During stage 13, egg diameter increases and rotation begins. In contrast to other species, the embryo rotation occurs early in development: *Rhinella (Bufo) arenarum* (Hensel, 1867), stage 15 – Del Conte & Sirlin (1951); *Pleurodema thaul*, stage 17 – Alay (1959); *P. brachyops*, stage 18 – Leon-Ochoa & Donoso-Barros (1970). From stage 16 until hatching (Fig. 1Q) the embryo increases in length, reaching three times the height and more than twice the original length. This elongation period lasted about 21 hours (stage 19; Figs 1R–T). The disappearance of the adhesive organs occurred between stages 24 and 25, later than reported (stage 21) in the general system proposed by Gosner (1960). On the other hand, operculum development began earlier than proposed by Gosner (1960).

Later, during the period of larvae with external gills (~48 hours; Figs 2A–E, 2H–L), non-feeding tadpoles showed scarce mobility. Stage 25 (larvae with internal gills; Figs 2F–G, 2M–O) was the longest one (8 days). Jorquera & Molinari (1979) defined this stage for *Batrachyla taeniata* as a transition period. In *O. cordobae* this stage is related to the organ rearrangement, morphological progression and body mass increment that leads newly hatched tadpole to reach its typical free-swimming larval form.

Throughout the pre-metamorphosis period (~42 days), hind limbs and toes were completely developed (Fig. 3). Similarly to species of cycloramphids and other groups studied, the hind limbs develop earlier than forelimbs (Vera Candioti et al. 2011). The formation of the hind limbs, extending from stage 26 to stage 41, presents a peculiarity that distinguishes it from the general pattern (Gosner 1960) and other cycloramphid (*R. darwini* – Jorquera et al. 1974): the fingers 3, 2 and 1 from stage 34, and metatarsal tubercles from stage 36 appear simultaneously (Figs 3F–L).

Stage 43 (Fig. 4B) is presented as a critical stage in the metamorphosis of *O. cordobae*, which includes most of the changes that occur during the metamorphic climax. This was evident in the rapid absorption of the tail, which was reduced to a vestige in about half a day. Finally, during the metamorphic climax a number of critical changes took place that transformed the aquatic larva in a juvenile with body characteristics of an organism adapted to terrestrial life: absorption of the tail and the larval mouth parts, pulmonary function, histological reorganization of digestive tube and the appearance of the general characters of the adult.

Further studies on related species would allow the comparison of different developmental stages at different taxonomic levels and the identification of new diagnostic characters.

Acknowledgements

The Secretary Research and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18/C350. P. Grenat and L. Zavala Gallo thank CONICET – Argentina (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) for a granted fellowship. Our study was authorized by Cordoba Environmental Agency (A.C.A.S.E.).

References

- Alay H.F. 1959. Embriogénesis de *Pleurodema bibroni* Tschudi (Amphibia: Salientia). Tesis Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago.
- Altig R. & McDiarmid R.W. 1999. Body plan. Development and morphology, pp. 24–51. In: McDiarmid R.W. & Altig R. (eds), Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae, University of Chicago Press, Chicago. ISBN-10 0226557626
- Amaro R.C., Pavan D. & Trefaut Rodrigues M. 2009. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim and Caramaschi 1980 (Anura, Cycloramphidae). *Zootaxa* **2071**: 61–68.
- Barrio A. 1964. Caracteres etoecológicos diferenciales entre *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron) y *O. occidentalis* (Berg) (Anura, Leptodactylidae). *Physis* **24** (68): 385–390.
- Brachet J. 1977. An old enigma: The gray crescent of amphibian eggs, pp. 133–139. In: Moscona A.A. & Monroy A. (eds), Pattern Development, Vol. 11, Academic Press, New York, 222 pp.
- Brandão R.A. & Batista C.G. 2000. Descrição do girino de *Odontophrynus salvatori* (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia Ser. Zool.* **89**: 165–170.
- Caramaschi U. 1979. O girino de *Odontophrynus carvalhoi* Savage and Ceí 1965 (Amphibia, Anura, Ceratophrydidae). *Rev. Brasil. Biol.* **39** (1): 169–171.
- Ceí J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano Nuova Serie, Monografia* **2**: 1–609.
- Ceí J.M. 1987. Additional notes to Amphibians of Argentina: an update, 1980–1986. *Monitore Zoologico Italiano, Nuova Serie, Supplemento*, Firenze **21**: 209–272.
- Ceí J.M. & Crespo E.G. 1982. Differences in larval morphology of allopatric isolated populations of the *Odontophrynus occidentalis* group from western Argentina. *Arquivos do Museu Bocage A1* (14): 335–340.
- Ceí J.M., Ruiz I.R.G. & Beçak W. 1982. *Odontophrynus barrioi*, a new species of Anuran from Argentina. *J. Herpetol.* **16**: 97–102. DOI: 10.2307/1563800
- Del Conte E. & Sirlin J.L. 1951. Serie tipo de los primeros estadios embrionarios en *Bufo arenarum*. *Acta Zoologica Lilloana* **12**: 495–499.
- Di Tada I.E., Barla M.J., Martori R.A. & Ceí J.M. 1984. *Odontophrynus achalensis* una nueva especie de anfibio de la Pampa de Achala (Córdoba, Argentina). *Historia Natural (Corrientes)* **4** (17): 149–155.
- Dimitriew C. & Rowe L. 2005. Resource limitation, predation risk and compensatory growth in a damselfly. *Oecologia* **142** (1): 150–154.
- Duellman W.E. & Trueb L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw Hill Book Co, New York, 670 pp.
- Dünker N., Wake M.H. & Olson W.M. 2000. Embryonic and larval development in the caecilian *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia, Gymnophiona): A staging table. *J. Morphol.* **243** (1): 3–34.
- Fernández K. & Fernández M. 1921. Sobre la biología y reproducción de algunos batracios argentinos. I. *Cystignathidae*. *Ann. Soc. Cient. Arg.* **91**: 97–140.
- Gallardo J.M. 1963. Observaciones biológicas sobre *Odontophrynus americanus* (D. et B.) 1841. *Ciencia e Invest.* **19** (6): 177–186.
- Gosner K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**: 183–190.
- Grenat P.R., Zavala Gallo L.M., Salas N.E. & Martino A.L. 2009. The tadpole of *Odontophrynus cordobae* Martino and Sinsch 2002 (Anura, Cycloramphidae) from Central Argentina. *Zootaxa* **2151**: 66–68.
- Hentschel B.T. 1999. Complex life cycles in a variable environment: predicting when the timing of metamorphosis shifts from resource dependent to developmentally fixed. *Am. Natur.* **154**: 549–558. DOI: 10.1086/303263
- Iwasawa H. & Futagami J. 1992. Normal stages of development of a tree frog, *Hyla japonica* Günther. *Jpn. J. Herpetol.* **14**: 129–142.
- Jorquera B. & Molinari E. 1979. Estados de desarrollo normal de *Batrachyla taeniata* (Girard). *Medio Ambiente* **4**: 89–102.
- Jorquera B., Pugin E. & Goicoechea O. 1972. Tabla de desarrollo normal de *Rhinoderma darwini*. *Archivos de Medicina Veterinaria* **4**: 5–19.
- Laurila A. & Kujasalo J. 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J. Anim. Ecol.* **68** (6): 1123–1132. DOI: 10.1046/j.1365-2656.1999.00354.x
- Lavilla E.O. & Scrocchi G.J. 1991. Aportes a la herpetología del Chaco argentino. II – Nuevos datos sobre *Odontophrynus lavillai* Ceí 1985 (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica Lilloana* **40** (1): 33–37.
- Leon-Ochoa J. & Donoso-Barros R. 1970. Desarrollo embrionario y metamorfosis de *Pleurodema brachyops* (Cope) (Salientia-Leptodactylidae). *Bol. Soc. Biol. Concepción* **42**: 355–379.
- Limbaugh B.A. & Volpe P. 1957. Early development of the gulf coast toad, *Bufo valliceps* Wiegmann. *Am. Mus. Novit.* **1842**: 1–32.
- Martino A.L. & Sinsch U. 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *J. Zool. Lond.* **257**: 67–81. DOI: 10.1017/S0952836902000663
- Martino A.L. 1999. Análisis estructural de una comunidad de anfibios anuros (Barreto, Córdoba, Argentina). Ph.D. Thesis. Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, 152 pp.

- McDiarmid R.W. & Altig R. 1999. Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. The University of Chicago Press, Chicago and London, 444 pp. ISBN: 0-226-55762-6
- 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. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2004.00744.x
- Morey S. & Reznick D. 2004. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos* **104**: 172–190. DOI: 10.1111/j.0030-1299.2004.12623.x
- Niehaus A., Wilson R.S. & Franklin C.E. 2006. Short- and long-term consequences of thermal variation in the larval environment of anurans. *J. Anim. Ecol.* **75** (3): 686–692. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2006.01089.x
- Nieuwkoop P.D. & Faber J. 1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland Publishing Co, Amsterdam, 252 pp. ISBN: 0-8153-1896-0
- Raff R.A. 1996. The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form. University of Chicago Press, Chicago and London, 544 pp. ISBN: 9780226702667
- Rosset S. 2008. New species of *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken 1862 (Anura: Neobatrachia) from Brazil and Uruguay. *J. Herpetol.* **42** (1): 134–144. DOI: 10.1670/07-088R1.1
- Rosset S., Baldo D., Lanzone C. & Basso N.G. 2006. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *J. Herpetol.* **40** (4): 465–477. DOI: 10.1670/0022-1511(2006)40[465:ROTGDO]2.0.CO;2
- Salthe S.N. & Mecham J.S. 1974. Reproductive and courtship patterns, pp. 309–521. In: Lofgren J.P. (ed.), *Physiology of the Amphibia*, Vol 2, Academic Press, New York. ISBN: 0124554024
- Savage J.M. & Cei J.M. 1965. A review of the leptodactylid frog genus, *Odontophrynus*. *Herpetologica* **21**: 178–195.
- Segura-Solís S. & Bolaños F. 2009. Desarrollo embrionario y larva del sapo *Incilius aucoinae* (Bufonidae) en Golfito, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* **57** (Suppl. 1): 291–299.
- Shimizu S. & Ota H. 2003. Normal development of *Microhyla ornata*: The first description of the complete embryonic and larval stages for the microhylid frogs (Amphibia: Anura). *Curr. Herpetol.* **22** (2): 73–90. DOI: 10.5358/hsj.22.73
- Shumway W. 1940. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. I. External Form. *Anat. Rec.* **78**: 139–144. DOI: 10.1002/ar.1090780202
- Taylor A.C. & Kollros J.J. 1946. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* **94**: 2–23. DOI: 10.1002/ar.1090940103
- Vera Candioti M.F., Úbeda C. & Lavilla E.O. 2005. Morphology and metamorphosis of *Eupsophus calcaratus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *J. Morphol.* **264** (2): 161–177. DOI: 10.1002/jmor.10320
- Vera Candioti M.F., Nuñez J.J. & Úbeda C. 2011. Development of the nidicolous tadpoles of *Eupsophus emiliopugini* (Anura: Cycloramphidae) until metamorphosis, with comments on systematic relationships of the species and its endotrophic developmental mode. *Acta Zool. (Stockholm)* **92** (1): 27–45. DOI: 10.1111/j.1463-6395.2010.00448.x
- Werneburg I. 2009. A standard system to study vertebrate embryos. *PLoS ONE* **4** (6): e5887. DOI: 10.1371/journal.pone.0005887

Received March 14, 2011
Accepted August 21, 2011

Reproductive behaviour and development dynamics of *Odontophrynus cordobae* (Anura, Cycloramphidae)

Pablo Raúl Grenat^{a,b}, Lucio Martín Zavala Gallo^{a,b}, Nancy Edith Salas^a and Adolfo Ludovico Martino^{a*}

^aEcología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina; ^bCONICET Fellowships

(Received 22 March 2011; final version received 24 December 2011; printed xxx)

We provide detailed information on breeding sites, release call, satellite behaviour, courtship, and embryonic and larval development of *Odontophrynus cordobae*. Field observations were carried out during two breeding seasons (2004–2005 and 2008–2009). Clutches were raised in captivity (artificial ponds) to analyse the development of embryos and tadpoles. Breeding sites were represented by streams and their backwaters, as well as temporary and permanent ponds of varying sizes. Operational sex ratio was male-biased varying between 0.154 and 0.25. Acoustic activity started about 8–10 pm and ended between 2 and 4 am the next day. Distance among calling males was approximately three metres. Male satellite behaviour was observed. Amplexus attempts among males were common. Release calls were structurally similar although shorter than advertisement calls. Courtship and formation of amplexus were documented.

Keywords: *Odontophrynus*; breeding behaviour; courtship; satellite male; release call

Introduction

The genus *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken consists of 10 recognized species distributed in southern and eastern South America (Rosset et al. 2006; Rosset 2008; Amaro et al. 2009). These species form four groups based on external morphology: *americanus*, *cultripes*, *moratoi* and *occidentalis* (Savage and Cei 1965; Cei 1987; Caramaschi 1996; Rosset 2008). The *americanus* group is currently represented by four species: *O. americanus* (Duméril and Bibron), *O. lavillai* Cei, *O. cordobae* Martino and Sinsch and *O. maisuma* Rosset. *Odontophrynus americanus* includes diploid and tetraploid forms. Diploid populations of central Argentina were revised by Martino and Sinsch (2002) and described as a new species, *O. cordobae*. The distribution of *O. cordobae* is restricted to central and north-western Córdoba and some populations in the southern Santiago del Estero province, Argentina (Martino and Sinsch 2002; Rosset et al. 2006). *Odontophrynus cordobae* is morphologically cryptic with its polyploid counterpart *O. americanus*, which is widely distributed in Argentina (Rosset et al. 2006). Some of the southernmost populations of *O. cordobae* coexist with populations of *O. americanus* in central-western Córdoba (Grenat, Salas et al. 2009). Few species

*Corresponding author. Email: amartino@exa.unrc.edu.ar; adolfofmartino@gmail.com

of *Odontophrynus* have been studied and only a few aspects of their natural history have been considered. Some general characteristics of reproductive behaviour of *O. cordobae* were briefly reported in the description of the species by Martino and Sinsch (2002) and a description of larvae and development is also available (Grenat, Zavala Gallo et al. 2009; Grenat et al. 2011). However, detailed information on reproductive behaviour is not known for this species and is often extrapolated from the related species, *O. americanus*. Here, we describe breeding sites, spatial relationships among active males, release call, satellite behaviour and courtship of *O. cordobae*. We also provide additional data on the dynamics of embryonic and larval development.

Materials and methods

Different natural history aspects related to reproductive behaviour of *O. cordobae* were studied during two breeding periods covering the spring and summer (September–April), between 2004–2005 and 2008–2009. We repeatedly visited 12 breeding sites spread out across the geographic range of the species in Córdoba province, Argentina. Minimum and maximum distance among sampling sites was approximately two and 200 km, respectively. The study area is characterized by a temperate climate, with an annual mean temperature of 18°C (mean maximum annual temperature = 23°C in January; mean minimum annual temperature = 6°C in July). The region is also characterized by the alternation of rainy and dry seasons, with rains typically starting in October and continuing throughout the warm months until March (annual mean rainfall = 800 mm) (Capitanelli 1979).

Observations using focal animals and observation points were made after rainfall, from 5 pm until early the next morning. Approximately 150–200 adult individuals of *O. cordobae* (including caller males, satellite males and amplexed females) were counted. The arrival of individuals to breeding sites and the specific call sites were registered. Stakes were inserted in the ground where males were active and then the distance between pairs of stakes was measured. Reproductive activity was scored based on the acoustic activity of individuals. The operational sex ratios (OSR) was estimated following Emlen and Oring (1977) as $OSR = (\text{number of adult females at the breeding site}) / (\text{total number of adults at the breeding site})$.

To describe release vocalizations of *O. cordobae*, we analysed 5–11 calls from nine *O. cordobae* individuals. Release calls were induced in the laboratory by a slight pressure in the axillary region (Leary 2001). Series of release calls were recorded using a Walkman digital audiotape (DAT) TCD-100™ and a Stereo Microphone Sony ECMMS907 (sample rate = 44.1 KHz; bit depth = 16 bits). The acoustic signals were digitalized and analysed by means of oscillograms, sonograms and power spectra using the software Adobe® Audition™ 1.0 (FFT: 1024 points). Each call series was characterized by five parameters: (1) call duration [ms]; (2) pulse/call [N]; (3) pulse duration [ms]; (4) interpulse duration [ms]; and (5) dominant frequency [Hz] (di Tada et al. 2001). The pulse rate (pulses/second) and pulse quotient (pulse duration/interpulse duration) were also calculated. Sound samples were deposited in the Sound Library of Ecology, Department of Natural Sciences, Faculty of Exact, Physical-Chemical and Natural Sciences, National University of Río Cuarto.

Additionally, two pairs in amplexus were captured and placed in artificial ponds 80 cm deep and 1 m diameter. These artificial ponds were maintained under environmental conditions similar to the natural habitat of *O. cordobae*. To avoid

contact with potential predators, the ponds were covered with a wire mesh. The females of the amplexed pairs spontaneously oviposited in the artificial ponds after capture. Samples from the artificial ponds were collected periodically (daily at the beginning of development, weekly at mid-developmental stages, and monthly at the end) to investigate development. To this aim, larval stages were classified following Grenat et al. (2011) and then clustered in six groups following Kehr and Basso (1992) but with some modifications: group 1 (stages 1–24), group 2 (stages 25), group 3 (stages 26–30), group 4 (stages 31–36), group 5 (stages 37–40) and group 6 (stages 41–46). Samples were taken by dragging the pond twice with an aquarium net (12.5 × 10 cm). Given that the pond was a closed system and all larvae came from the same cohort, we extrapolated the percentage of larvae in each group to the total cohort.

Results

Breeding site and acoustic activity

Although reproductively active populations were found from late August to early April, the most active period of *Odontophrynus cordobae* was between October and March. Breeding sites were found in backwaters along streams and in temporary and permanent ponds of varying size (from 32 m² to over 1000 m²). Most of these sites had riparian and semi-submerged vegetation that provided protection to callers. Males and females approached breeding sites at the same time preferentially moving through the waterway. Amplexus started as soon as acoustic activity began. Operational sex ratio measured on non-consecutive nights in a single reproductive site during the first breeding season varied between 0.154 (four females and 26 males) and 0.25 (one female and four males).

In most sampled sites, the acoustic activity began in the evening between 8 and 10 pm and ended between 2 and 4 am the next day. On some occasions however, especially following heavy rains, individuals began to call in the afternoon and the acoustic activity continued until the next morning. In general, intervals between calls were notably longer at the beginning (20–30 min) and at the end (7–10 min) of the daily acoustic activity.

Male–male interactions

Usually, males called from stream banks or pond edges, in and out of the water, and protected by riparian vegetation. Males called outside the water in those sites with vegetation neither on the banks nor in the water. Linear distances between calling males were measured on three non-consecutive nights. Mean distance, standard deviation and range per night were: (1st) ($n = 18$) 274.3 ± 151.7 cm (103–615 cm); (2nd) ($n = 9$) 365.5 ± 157.8 cm (55–531 cm); (3rd) ($n = 10$) 304.0 ± 160.6 cm (158–615 cm).

On several nights ($n = 10$) we observed satellite behaviour among males as an alternative strategy for obtaining mates. Satellite males remained motionless, silent and always located behind a vocalizing individual. One of them, for example, remained there for more than 40 minutes. The satellite male was located immediately behind the vocalizing male, but sometimes it approached its snout to the cloacal region of the caller, thus causing an abrupt increase in call repetition rate. Then, the calling male turned towards the satellite male and made a sound that was replied to by the satellite

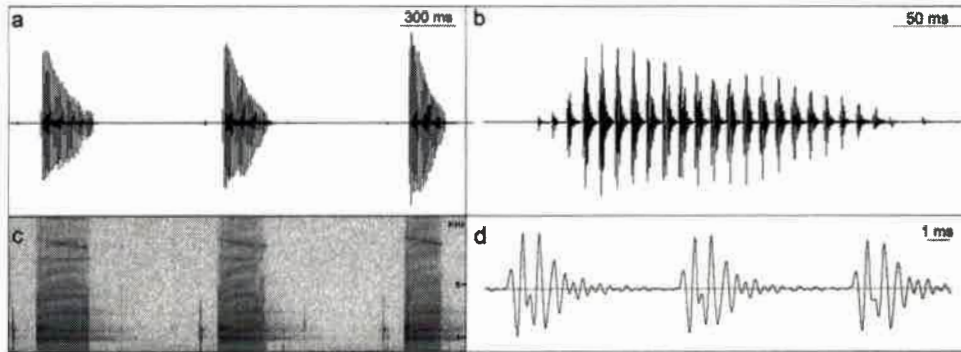


Figure 1. Release call of *Odontophrynus cordobae*: (a, c) oscillogram and sonogram of three calls; (b) detail of call; (d) detail of pulses.

male, which then left the area. Amplexus between a satellite male and a female was never observed.

Male-male amplexus attempts were common during nights with high reproductive activity (1–3 male-male amplexus in six nights). Furthermore, male-male amplexus were found inside the containers where they were transported when captured. In all cases, amplexed males responded with a characteristic release call, after which they separated. The release call of *O. cordobae* consisted of a single pulse train, structurally similar but shorter than its advertisement call (Figure 1). Mean and standard deviation of acoustic variables were: call duration = 193.1 ± 20.9 ms (range: 163.6–233.9 ms); pulse/call = 28 ± 3.8 (21.6–35.6); dominant frequency = 937.5 ± 103.6 Hz (836.7–1129.5 Hz); pulse duration = 3.5 ± 0.7 ms (2.2–4.3 ms); interpulse duration = 3.1 ± 0.6 ms (2.6–4.4 ms); pulse rate = 151.3 ± 10.5 (135.2–161.9); pulse quotient = 1.2 ± 0.3 (0.5–1.6).

Courtship

The complete sequence of courtship and formation of amplexus is shown in Figure 2. The male remains floating near the pond or stream edge with its forelegs resting on land or on a branch, with its head above water and hind limbs separated (Figure 2a, b). The female, completely submerged, comes up behind the male and places her head under the male's abdomen, in contact with him (Figure 2c, d). The male responds by vocalizing and increasing the call repetition rate. Once the female is entirely placed below the male, the male clasps the female in axillary amplexus (Figure 2e). Courtship lasts between 5 and 10 minutes. Pairs remained in amplexus between 13.4 and 36 hours.

Clutches and development

Females deposited all eggs at once, individually at the bottom of the ponds and dammed areas of streams, dispersed in semi-submerged vegetation (Figure 3a), or adhered to it (Figure 3b). Total number of eggs deposited by the two females in artificial ponds was 1180 and 7080, respectively.

Dynamics of embryonic and larval development (Figure 4), evaluated in captivity (beginning in late September), showed that group 1 (stages 1–24) decreases

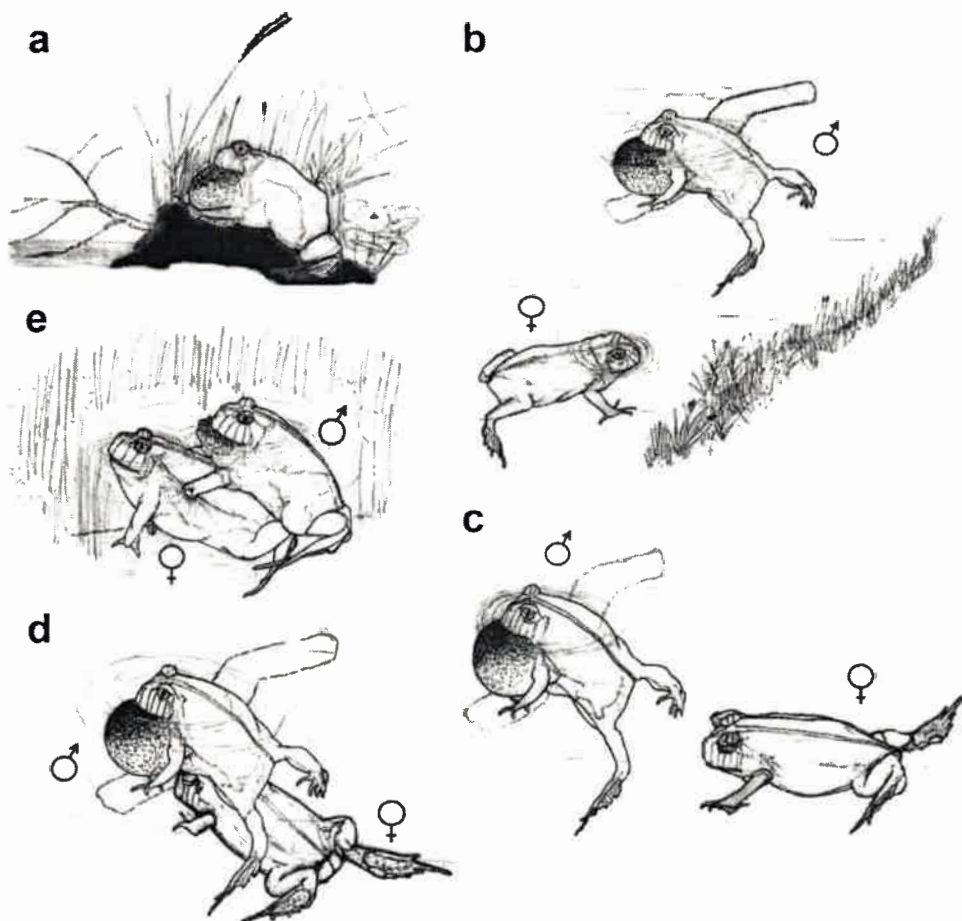


Figure 2. Courtship behaviour of *Odontophrynus cordobae*: (a) caller male at calling site; (b, c) submerged female approaching male and moving under his body; (d) female entirely located below the male and in physical contact with him; (e) male amplexing the female. Illustrations: L. Zavala Gallo.

in number of individuals during the first five days until complete disappearance (7 October). In the next 35 days only individuals of group 2 (stage 25) were sampled (8 October–12 November). At day 43 (14 November), approximately 70% of the cohort corresponded to group 3 (stages 26–30), and five days later group 4 individuals (stages 31–36) appeared. Approximately 6% of the total population reached group 5 (stages 37–40) during the subsequent three days (22 November). From that moment on, the highest percentage of tadpoles was concentrated in groups 3 (52%) and 4 (30%). By mid-January there still was a remnant of larvae belonging to group 2 (7%). Since its appearance, group 5 ranged between 5% and 30% of the cohort throughout the development and reached its highest percentage (40%) during the final stage (20 November, next year). Individuals belonging to group 6 (stages 41–46), which included juveniles, appeared two months after oviposition (28 November), and continued to appear until early May of the following year, reaching a peak of 89% by mid-March. During winter,

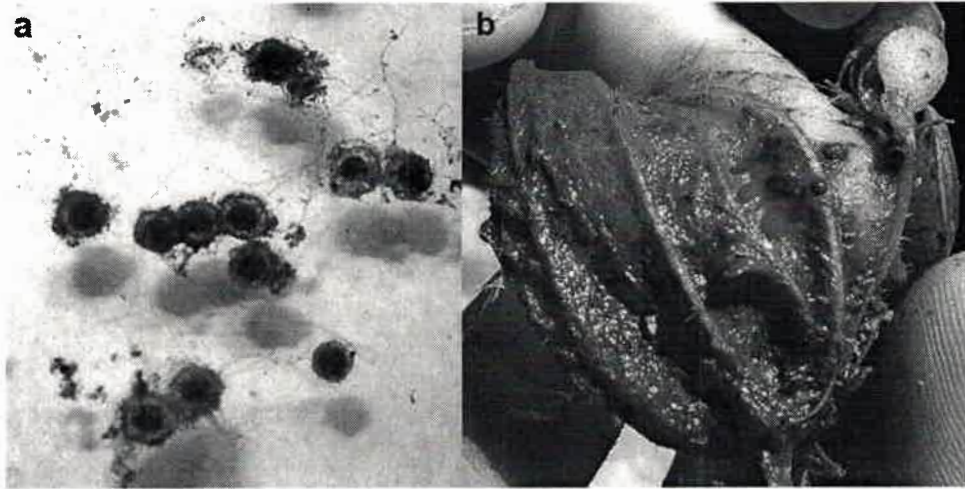


Figure 3. Eggs of *Odontophrynus cordobae*: (a) separated eggs; (b) eggs adhered to vegetation.

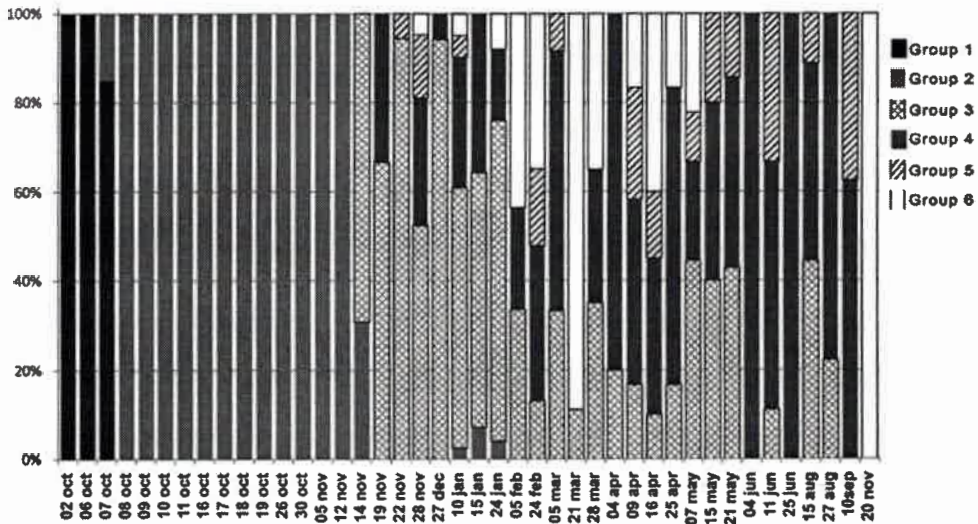


Figure 4. Dynamics of larval development for a complete cohort of *Odontophrynus cordobae*.

group 6 disappeared and the population was composed of individuals belonging to groups 3, 4 and 5 until mid-spring (20 November), when overwintering individuals completed their development.

Discussion

In subtropical and temperate regions characterized by seasonal rainfall, anuran breeding activity is typically initiated by rainfall (Duellman and Trueb 1986). Reproductive activity concentrated in the warmest months of the year is broadly reported for

anurans including cycloramphids in subtropical regions (e.g. Basso 1990; Kaefer et al. 2007, 2009). According to Martino and Sinsch (2002), the activity period of *Odontophrynus cordobae* adults begins with the first rainfalls of spring (late August or early September). These authors reported that the period with major reproductive activity includes September and October, but calling males may be found until mid-January. However, in this study, active individuals were found until late summer and some populations remained reproductively active until early April. According to Kaefer et al. (2009) this temporal reproductive strategy, although concentrated in only one season of the year, could not be considered explosive (Wells 1977), given that reproductive events occurred over several weeks. Kaefer et al. (2009), studying the breeding behaviour of cycloramphid *Limnomedusa macroglossa*, classified this temporal reproductive strategy as prolonged, although highly seasonal.

Martino and Sinsch (2002) reported that *O. cordobae* breeds exclusively in small streams, and often in syntopy with *O. occidentalis*. Additionally, we found that most breeding sites for *O. cordobae* were represented by ponds of varying size and, on several occasions, *O. cordobae* individuals were in contact with individuals of their closely related species, *O. americanus* (Grenat et al. unpublished data). Barrio (1964) compared ethological and ecological aspects of *O. americanus* and *O. occidentalis*. However, since this work was previous to the description of *O. cordobae* and it is unclear whether all observations were made in syntopic areas with *O. occidentalis*, it is difficult to make comparisons with all points raised by this author.

Operational sex ratio found in our study reveals the existence of approximately 4–7 active males for each female in a breeding site. This male bias, along with the average distance found between males (approximately 3 m), and the absence of territorial behaviour, would place *O. cordobae* as a species with polygynous mating system with male dominance type *lek* (Emlen and Oring 1977). Given that in this mating system the number of available males per female is quite high, females take the initiative in selecting a partner, moving towards the vocalizing male as in most anurans (Salthe and Mecham 1974). In many frogs, including *O. cordobae*, females have to make physical contact with the male to initiate amplexus (see Wells 1977). Thus, *O. cordobae* courtship is complex and includes a behavioural repertoire of vocal and tactile interactions.

Alternative male strategies are known to occur when female density is low at breeding aggregations (Toledo and Haddad 2005; Pombal and Haddad 2007). The most widespread strategy in anurans is satellite behaviour (e.g. *Rana calamitans* – Wells 1977; *Hyla cinerea* – Garton and Brandon 1975; Humfeld 2008; *Bufo calamita* – Arak 1988; Tejedo 1992). In general, satellite males associate with actively vocalizing males and attempt to intercept and mate females approaching those calling males (Lucas et al. 1996). Satellites may have lower immediate reproductive success than callers, but at a lower cost in terms of both predation risk (Howard 1978) and energy expenditure (Lucas et al. 1996). This behaviour has never been reported for the genus *Odontophrynus*. In most cited examples, satellite males belonging to other species showed a passive attitude (e.g. Leary et al. 2004). Conversely, satellites of *O. cordobae* approach and contact the urogenital tract of their competitor. This strategy of imitating a female behaviour increases call frequency in the caller male, and probably improves the likelihood of the satellite male mating. An alternative male reproductive behaviour could be to constrain female preferences. Anuran female mate choice may be constrained if males circumvent their choices by intercepting females approaching

a selected male (Sullivan and Kwiatkowsky 2007). Actually, we have observed neither an amplexus between a satellite male and a female, nor a successful coupling of the associated vocalizing male. For this reason, we cannot be sure that this is a successful strategy in the species, but we cannot say the opposite either.

Release vocalizations are produced by anuran males in response to male mating attempts (Blair 1947; Brown and Littlejohn 1972). Rapid release of an amplexing male would be advantageous in conserving energy, preventing gametic wastage, reducing exposure to predation, and increasing available time for breeding opportunities (Blair 1968). Barrio (1964) showed sonograms of release vocalization for *O. americanus* and *O. occidentalis*, but call measurements were not reported. This author noted a similarity in the structure of advertisement calls and release calls of *O. americanus*, as we observed for *O. cordobae*. We compared our results with the acoustic parameter values reported by Martino and Sinsch (2002) for the advertisement call of *O. cordobae*. The pulse number and duration of the release call was approximately half that of the advertisement call. While the pulse duration was similar, the interpulse duration was significantly lower in the release call, which resulted in a higher value for pulse rate than reported by Martino and Sinsch (2002).

Advertisement calls of *O. cordobae* and *O. americanus* have the same structure (Martino and Sinsch 2002), so their release calls are also expected to be similar (Grenat unpublished data). Martino and Sinsch (2002) reported notable differences in the acoustic parameters of advertisement calls of these species, which could act as a reproductive barrier between them. In contrast, Leary (2001) suggested that selection favouring prompt release during heterospecific amplexus should result in convergent character displacement in release vocalizations. However, di Tada et al. (2001) suggested that the similarity in the structure of release calls in the *Bufo* (*Rhinella*) *spinolus* group may result in the avoidance of heterospecific amplexus between sympatric toads. They also proposed that these species-specific characters of the release calls could be used as taxonomic characters. Further analysis on *O. americanus* release calls are needed to determine whether there are any variables that allow the differentiation between these two related species, as with their advertisement call (Martino and Sinsch 2002).

Most neobatrachians show axillary amplexus (Duellman and Trueb 1986). *Odontophrynus cordobae* axillary amplexus, particularly, was similar to that reported for *O. occidentalis* by Bionda et al. (2005). Gallardo (1963) mentioned a more lumbar amplexus for *O. americanus*, although our observations for this species agree with an axillary amplexus as in *O. cordobae*.

Eggs were deposited individually and sank to the bottom of streams and temporary ponds. This observation is coincident with other authors (Gallardo 1963; Barrio 1964; Martino and Sinsch 2002; Grenat, Zavala Gallo et al. 2009) and fits the reproductive mode type 1 according to Lavilla and Rouges (1992). This type of oviposition is also reported in *O. americanus*, *O. cultripes* and *O. occidentalis* (Cei 1980) and other cycloramphids, such as *Thoropa* (Giaretta and Facure 2003) and *Limnomedusa* (Kaefer et al. 2009). Gallardo (1972) observed partial clutches attached to submerged vegetation. We also observed some eggs associated with vegetation but this is not enough evidence to confirm the occurrence of reproductive mode type 2 (Lavilla and Rouges 1992). Instead, it seems to be a consequence of the deposition of individual eggs, some of which get accidentally attached to vegetation.

Complete development of *O. cordobae* took approximately two months in laboratory conditions at 20°C (Grenat et al. 2011). Martino and Sinsch (2002) determined that aquatic development, until metamorphosis, took about 2 to 3 weeks under field conditions. In this study, in captivity, the first metamorphosed individuals appeared around day 60, although a high percentage of the cohort remained as feeding tadpoles (stages 3 and 4) during the winter and continued metamorphosing even 13 months after oviposition. This duration is similar to that reported by Fernandez and Fernandez (1921) in *Odontophrynus* individuals from northern Córdoba. On the other hand, Gallardo (1963) found that the development of *Odontophrynus americanus* individuals from Buenos Aires approximately took 7–8 months. However, Martino (1999) observed clutches of *O. americanus* from southern Córdoba completing their development in 12 to 15 days in nature. Differences in the duration of complete development are influenced by the environments in which clutches are located and evolve. Most significant effects on developmental time and metamorphosis are related to temperature, which fluctuates both daily and seasonally, and may cause either an increase or a decrease in the duration of different stages (Duellman and Trueb 1986; Salthe and Mecham 1974). The early work of Lillie and Knowlton (1897) demonstrated the negative correlation between developmental time and temperature in amphibians. In temperate regions, temperature fluctuations among seasons may influence the duration of the different developmental stages. Thus, larvae that have not yet metamorphosed when winter begins suffer a slowdown in development that is reactivated with warmer temperatures in spring. In addition, we hypothesize that this plasticity in development duration may be related to the variety of sites used by *O. cordobae* for reproduction (temporary or permanent). Thus, the eggs laid in seasonal aquatic environments may show faster development than those litters that grow in permanent aquatic environments.

Observational data on natural history of a species in natural settings helps to design experiments that could shed some light on the functional basis of its behaviour (Lüddecke 1999) and its interactions with near syntopic species. In this sense, further studies on reproductive behaviour and other natural history aspects in related species could help to improve our understanding of relationships in different taxonomic levels.

Acknowledgements

The Secretary of Research and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18/C350. The authors thank Rafael Marquez and anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions to improve the quality of the paper. PRG and LZG thank CONICET – Argentina (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) for fellowship granted. Our study was authorized by Córdoba Environmental Agency (ACASE).

References

- Amaro RC, Pavan D, Trefaut Rodrigues M. 2009. On the generic identity of *Odontophrynus moratoi* Jim and Carmaschi, 1980 (Anura, Cycloramphidae). *Zootaxa*. 2071:61–68.
- Arak A. 1988. Callers and satellites in the natterjack toad: evolutionarily stable decision rules. *Anim Behav*. 36:416–432.
- Barrio A. 1964. Caracteres eto-ecológicos diferenciales entre *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron) y *O. ccidentalis* (Berg) (Anura, Leptodactylidae). *Physis*. 24:385–390.

- Basso NG. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. *Cuad Herpetol.* 1:1–69.
- Bionda C, Giordana MB, Martori R. 2005. Oviposición en *Odontophrynus occidentalis*. *Bol Asoc Herp Esp.* 16:56–57.
- Blair AP. 1947. The male warning vibration in *Bufo*. *Am Mus Nov.* 1344:1–7.
- Blair WF. 1968. Amphibians and reptiles. In: Sebeok TA, editor. *Animal Communication*. Bloomington: Indiana University Press. p. 289–310.
- Brown LE, Littlejohn MJ. 1972. Male release call in the *Bufo americanus* group In: Blair WF, editor. *Evolution in the Genus Bufo*. Austin: University of Texas Press. p. 310–323.
- Capitanelli RG. 1979. III. Clima. In: Vázquez JB, Miatello RA, Roqué ME, editors. *Geografía física de la provincia de Córdoba*. Buenos Aires: Editorial Boldt. p. 45–138.
- Caramaschi U. 1996. Nova espécie de *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken, 1862 do Brasil Central (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Bol Mus Nac (Rio de Janeiro)*. 367:1–8.
- Cei JM. 1987. Additional notes to Amphibians of Argentina: an update, 1980–1986. *Mon Zool Ital.* 21: 209–272.
- di Tada IE, Martino A, Sinsch U. 2001. Release vocalizations in neotropical toads (*Bufo*): ecological constraints and phylogenetic implications. *J Zool Syst Evol Res.* 39:1–23.
- Duellman WE, Trueb L (1986) *Biology of Amphibians*. New York: McGrawHill Book Co.
- Emlen ST, Oring LW. 1977. Ecology, Sexual Selection, and the Evolution of Mating Systems. *Science.* 197:215–223.
- Fernández K, Fernández M. 1921. Sobre la biología y reproducción de algunos batracios argentinos. I. Cystignathidae. *An Soc Cient Arg.* 91:97–139.
- Gallardo JM. 1963. Observaciones biológicas sobre *Odontophrynus americanus* (D. et B.) 1841. *Cienc Invest.* 19:177–186.
- Gallardo JM. 1972. Anfíbios de la provincia de Buenos Aires. Observaciones sobre su ecología y zoogeografía. *Cienc Invest.* 28:3–14.
- Garton JS, Brandon RA. 1975. Reproductive ecology of the Green Treefrog, *Hyla cinerea*, in southern Illinois (Anura: Hylidae). *Herpetologica.* 31:150–161.
- Giaretta AA, Facure K. 2003. *Cycloramphus boraceiensis*: egg clutch attendance. *Herpetol Rev.* 34:50.
- Grenat PR., Salas NE, Martino AL. 2009. Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa.* 2049: 67–68.
- Grenat PR, Zavala Gallo LM, Salas NE, Martino AL. 2009. The tadpole of *Odontophrynus cordobae* Martino and Sinsch 2002 (Anura, Cycloramphidae) from Central Argentina. *Zootaxa.* 2151:66–68.
- Grenat PR, Zavala Gallo LM, Salas NE, Martino AL. 2011. Embryonic and larval stages in development of *Odontophrynus cordobae* (Anura, Cycloramphidae). *Biologia.* 66:1148–1158.
- Howard RD. 1978. The evolution of mating strategies in bullfrogs, *Rana catesbeiana*. *Evolution.* 32:850–871.
- Humfeld SC. 2008. Intersexual dynamics mediate the expression of satellite mating tactics: unattractive males and parallel preferences. *Anim Behav.* 75:205–215.
- Kaefer IL, Boelter RA, Cechin SZ. 2007. Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. *Annal Zool Fenn.* 44:435–444.
- Kaefer IL, Both C, Cechin SZ. 2009. Breeding biology of the rapids frog *Limnomedusa macroglossa* (Anura: Cycloramphidae) in southern Brazil. *J Nat Hist.* 43:1195–1206.
- Kehr AI, Basso N. 1992. Consideraciones sobre la estructura de edades, supervivencia y tiempo de metamorfosis en los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Anura: Hylidae). *Acta Zool Lill.* 41:125–133.
- Lavilla EO, Rouges M. 1992. Reproducción y desarrollo de anuros argentinos. *Monog N° 5.* Asoc Herp Arg. 1–66.

- Leary CJ. 2001. Evidence of convergent character displacement in release vocalizations of *Bufo fowleri* and *B. terrestris* (Anura; Bufonidae). *Anim Behav.* 61:431–438.
- Leary CJ, Jessop TS, Garcia AM, Knapp R. 2004. Steroid hormone profiles and relative body condition of calling and satellite toads: implications for proximate regulation of behavior in anurans. *Behav Ecol.* 15:313–320.
- Lillie FR, Knowlton FP. 1897. On the effect of temperature on the development of animals. *Zool Bull.* 1(4):180–182.
- Lucas JR, Howard RD, Palmer JG. 1996. Callers and satellites: chorus behaviour in anurans as a stochastic dynamic game. *Anim Behav.* 51:501–518.
- Lüddecke H. 1999. Behavioral aspects of reproductive biology of the Andean frog *Colostethus palmatus* (Amphibia: Dendrobatidae). *Rev Acad Colomb Cienc.* 23:303–316.
- Martino AL. 1999. Análisis estructural de una comunidad de anfibios anuros (Barreto, Córdoba, Argentina). PhD. Thesis. 152 pp. Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Martino AL, Sinsch U. 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *J Zool* (London). 257:67–81.
- Pombal JP Jr, Haddad CFB. 2007. Estratégias e modos reprodutivos em anuros. In: Nascimento LB, Oliveira ME, editors. *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. p. 101–116.
- Rosset S. 2008. New Species of *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken 1862 (Anura: Neobatrachia) from Brazil and Uruguay. *J Herpet.* 42:134–144.
- Rosset S, Baldo D, Lanzone C, Basso NG. 2006. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *J Herpetol.* 40:465–477.
- Salthe SN, Mecham JS. 1974. Reproductive and courtship patterns. In: Lofts B, editor. *Physiology of the Amphibia*, Vol II. New York: Academic Press. p. 309–521.
- Savage JM, Cei JM. 1965. A review of the leptodactylid frog genus, *Odontophrynus*. *Herpetologica.* 21:178–195.
- Sullivan BK, Kwiatkowsky MA. 2007. Courtship displays in anurans and lizards: theoretical and empirical contributions to our understanding of costs and selection on males due to female choice. *Funct Ecol.* 21:666–675.
- Tejedo M. 1992. Large male mating advantage in natterjack toads, *Bufo calamita*. Sexual selection or energetic constraints? *Anim Behav.* 44:557–569.
- Toledo LF, Haddad CFB. 2005. Reproductive biology of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. *J Nat Hist.* 39:3029–3037.
- Wells KD. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Anim Behav.* 25:666–693.



UNRC
Biblioteca Central



71193

71193