

BARAQUET, MARIANA
Análisis bioquímico

2012

71212

71212

MFN:
Clasif:
T-774



TESIS DOCTORAL
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

71212



**Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo
pulchella (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la
región central de Argentina**

Licenciada Mariana Baraquet

Director de Tesis Dr. Adolfo L. Martino

Miembros de la Comisión Asesora y Jurado de Tesis:

Dr. H. Hugo Varela (Universidad Nacional de Río Cuarto).....

Dr. Rafael C. Lajmanovich (Universidad Nacional del Litoral).....

Dr. Arturo I. Kehr (CECOAL-CONICET).....

Universidad Nacional de Río Cuarto

Marzo de 2012

A Diego, por hacer de mi vocación parte de la suya...

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de distintas maneras han permitido que este trabajo se haya hecho posible y que me han ayudado a lo largo de este camino...

A Adolfo, gracias por haber puesto tu confianza y permitirme comenzar este trabajo bajo tu dirección... gracias por el apoyo en poder seguir trabajando con "Hylas" y defender nuestras ideas... gracias por el conocimiento y experiencia brindada...

A Nancy, gracias por estar en todo... por poder seguir aprendiendo de vos tantas cosas... por la ayuda infinita...

Al los miembros de la Comisión Asesora y Jurado de Tesis, Dr. Hugo Varela, Dr. Rafael Lajmanovich y Dr. Arturo Kehr... por los aportes y sugerencias que enriquecieron este trabajo, muchas gracias por la ayuda y siempre buena predisposición...

A Diego, por bancarme en todo... por los tantos y tantos asados, vacaciones, etc. que se perdió por acompañarme a los muestreos, y por comprender siempre que además de que esto es parte de mi formación es lo que disfruto y amo hacer...

A Felipe... por su infinito amor... y porque a su manera desde chiquito supo comprender que las ausencias de mamá eran parte de su trabajo...

A mi familia, por su apoyo y ayuda de siempre Abuela Poro, Mamá, Papá, Emilia, Valentina, Magui, Luci, Fede, Emiliano y Sole, tíos, primos y sobrinos...

A quienes yo bauticé como P.U.M. (personas de usos múltiples)... Pablo y Julián... buenos compañeros de trabajo, buenos profesionales y excelentes personas... me han enseñado desde tomar mate amargo hasta hacer análisis estadísticos... muchas gracias por la inmensa ayuda en los muestreos, por aguantar mis consultas y por las tantas veces que también han hecho de psicólogos cuando las cosas no funcionaron bien... por el humor y la chispa que hacen que el lugar de trabajo sea distendido y agradable... y por el respeto a esta "persona mayor"...

A toda la cátedra de Ecología, Ismael muchas gracias por sus consejos y sugerencias, Clari gracias por las charlas, los mates y las discusiones enriquecedoras, a Ana Laura y los recién llegados Manu, Bruno, Selene, Fabio y especialmente a Zulma y Cele con quienes estoy aprendiendo cosas nuevas he interesantes...

A la gente de la cátedra de Antropología, Hugo, Tito, Silvia y Wini, con quienes he compartido almuerzos con charlas, discusiones, consejos y mucho mucho humor...

A mis amigas y compañeras de carrera Sonia y Belén... por seguir estando...

A mis amigos de la vida...Cristinita, Elisa, Soledad, Belén, Daniela, Fabián y Xime...

A los amigos de las juntadas de los viernes y sábado, Cecilia, Germán y Lucas... que con el asadito y el karaoque han permitido cargar las pilas para empezar cada nueva semana...

A la flia. Politano, siempre presentes... Mari, Fernando, Juan, Alfi, Clemi y Fran...

A la tía Silvia... por sus tantos y tantos abrazos musicales...

A Andrés por habernos prestado el auto cuando todavía no teníamos uno propio para salir a muestrear...

A toda la gente que ayudo en el cuidado de Felipe durante los muestreos y demás... mi familia, la tía Silvia, Ana Luz, nona Estela, Vivi, tía Marcela y tío Omar, Miriam, Yami y Leo, Agustina, Andrés, Cristina, Nano, Eugenia, tía Negra y tía María, María Elena...

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y a la Secretaría de Posgrado de la Facultad de Ciencias Exactas, por permitir mi formación académica, en especial a Marisa Rovera por su ayuda y su siempre buena predisposición para solucionarnos problemas...

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas otorgadas que posibilitaron la realización de este trabajo...

A quienes se que me acompañan y siguen viviendo en mí... Laura, Tío Lolo, mis abuelos Carmen, Abel y Coco, Javier, Lorena y Pascual...

ÍNDICE GENERAL

Sección	Pág.
RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Morfometría.....	3
1.2. Eritrometría.....	5
1.3. Citogenética.....	6
1.4. Bioacústica.....	8
1.5. Las especies en estudio.....	12
1.6. Objetivos.....	14
1.6.1. Objetivo General.....	14
1.6.2. Objetivos Específicos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Taxonomía de las especies en estudio.....	15
2.2. Descripción de las especies.....	16
2.2.1. <i>Hypsiboas cordobae</i>	17
2.2.2. <i>Hypsiboas pulchellus</i>	18
2.2.3. <i>Hypsiboas riojanus</i>	20
2.2.4. <i>Hypsiboas andinus</i>	20
2.3. Áreas de Muestreo.....	22
2.4. Procedimientos de Campo.....	35
2.5. Procedimientos de Laboratorio.....	35
2.5.1. Morfología externa de los adultos.....	35
2.5.2. Eritrometría.....	37

2.5.3. Citogenética.....	39
2.5.4. Bioacústica.....	41
3. RESULTADOS.....	45
3.1 Resultados generales.....	45
<i>Hypsiboas cordobae</i>	49
Morfometría.....	49
Eritrometría.....	58
Citogenética.....	61
Bioacústica.....	66
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	76
Morfometría.....	76
Eritrometría.....	82
Citogenética.....	83
Bioacústica.....	87
<i>Hypsiboas riojanus</i>	92
Morfometría.....	92
Eritrometría.....	94
Citogenética.....	95
Bioacústica.....	96
<i>Hypsiboas andinus</i>	100
Morfometría.....	100
Eritrometría.....	102
Citogenética.....	103
Bioacústica.....	104

3.3 Comparación entre especies.....	107
3.3.1. Morfometría.....	107
3.3.2. Eritrometría.....	115
3.3.3. Citogenética.....	122
3.3.4. Bioacústica.....	125
4. DISCUSIÓN.....	135
4.1. Morfometría.....	135
4.2. Eritrometría.....	142
4.3. Citogenética.....	145
4.4. Bioacústica.....	147
5. CONSIDERACIONES FINALES.....	157
6. BIBLIOGRAFÍA.....	160

ÍNDICE DE TABLAS

	Títulos	Pág.
Tabla 1	Especies y sitios de muestreo donde se realizaron los registros acústicos, el relevamiento de variables ambientales y la colecta de ejemplares adultos. N=167.	23
Tabla 2	Especie, número de individuos analizados mediante morfometría y eritrometría, localidad y provincia de los sitios de captura.	45
Tabla 3	Especie, localidad, provincia y número de individuos analizados mediante citogenética.	46
Tabla 4	Especie, número de individuos examinados, número de cantos analizados, localidad y provincia de los ejemplares estudiados mediante bioacústica.	48
Tabla 5	Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) de <i>H. cordobae</i> (72♂/14♀).	50
Tabla 6	Promedios de las 15 variable morfológica (mm) de <i>H. cordobae</i> (72♂/14♀) de las seis poblaciones en estudio.	51
Tabla 7	Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos y hembras de <i>H. cordobae</i> . W representa el estadístico Shapiro-Wilk (W) y p la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.	52
Tabla 8	Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar en morfometría individuos machos y hembras de <i>H. cordobae</i> . El asterisco indica las variables en las que las diferencias morfológicas no resultaron significativas.	54
Tabla 9	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas de <i>H. cordobae</i> para las seis poblaciones estudiadas. 1. La Carolina; 2. Pampa de Achala; 3. Achiras; 4. Las Guindas; 5. Los Tabaquillos; 6. Los Linderos.	56
Tabla 10	Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos, de acuerdo al sexo.	58
Tabla 11	Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar en eritrometría individuos machos y hembras de <i>H. cordobae</i> . El asterisco indica las variables en las que las diferencias morfológicas resultaron significativas.	58
Tabla 12	Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos por población	59
Tabla 13	Número de células en metafase, en diacinesis y en Meiosis II de individuos de <i>H. cordobae</i> para cada localidad.	61
Tabla 14	Parámetros del complemento cromosómico utilizados para la elaboración del ideograma de <i>H. cordobae</i> fórmula cariológica (5:7); NF=48.	64
Tabla 15	Células en diacinesis en las que se observaron las diferentes figuras meióticas.	65
Tabla 16	Medias, desvíos y rangos de las variables acústicas analizadas para <i>H.</i>	67

cordobae.

Tabla 17	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. cordobae</i> en cada tipo de canto. N = 60.	69
Tabla 18	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. cordobae</i> para las seis poblaciones estudiadas.	70
Tabla 19	Valores de <i>p</i> y F del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de <i>H. cordobae</i> para las seis poblaciones estudiadas. El asterisco indica las variables en las que las diferencias no fueron significativas.	71
Tabla 20	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas de <i>H. cordobae</i> para las seis poblaciones estudiadas. 1. La Carolina; 2. Pampa de Achala; 3. Achiras; 4. Las Guindas; 5. Los Tabaquillos; 6. Los Linderos.	73
Tabla 21	Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) (59 ♂).	77
Tabla 22	Promedios de las 15 variable morfológica (mm) de <i>H. pulchellus</i> (59 ♂) de las tres poblaciones en estudio.	77
Tabla 23	Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos de <i>H. pulchellus</i> . W representa el estadístico Shapiro-Wilk y <i>p</i> la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.	78
Tabla 24	Valores de <i>p</i> y F del ANOVA realizado para comparar las variables morfométricas de <i>H. pulchellus</i> para las tres poblaciones en estudio.	79
Tabla 25	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas de <i>H. pulchellus</i> para las tres poblaciones estudiadas.	80
Tabla 26	Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos.	82
Tabla 27	Número de células en metafase, en diacinesis y en Meiosis II de individuos de <i>H. pulchellus</i> para cada localidad.	83
Tabla 28	Parámetros del complemento cromosómico utilizados para la elaboración del ideograma de <i>H. pulchellus</i> fórmula cariológica (1:5:6); NF=48.	84
Tabla 29	Células en diacinesis en las que se observaron las diferentes figuras meióticas.	86
Tabla 30	Medias y desvíos de las variables analizadas para <i>H. pulchellus</i> , para cantos de una y dos notas.	88
Tabla 31	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. pulchellus</i> , para cada localidad estudiada.	89
Tabla 32	Valores de <i>p</i> y F del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de <i>H. pulchellus</i> para las tres poblaciones estudiadas. El asterisco indica las variables en las que las diferencias no fueron significativas.	89
Tabla 33	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables acústicas de <i>H. pulchellus</i> para las tres	91

poblaciones estudiadas.

Tabla 34	Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (<i>mm</i>) de <i>H. riojanus</i> (5♂/1♀).	93
Tabla 35	Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos y hembras de <i>H. riojanus</i> . <i>W</i> representa el estadístico Shapiro-Wilk y <i>p</i> la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.	94
Tabla 36	Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos.	94
Tabla 37	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. riojanus</i> .	96
Tabla 38	Número de individuos y las diferentes maneras en las que se alternan los tipos de canto.	98
Tabla 39	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. riojanus</i> en cada tipo de canto.	98
Tabla 40	Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (<i>mm</i>) de <i>H. andinus</i> (9♂/1♀).	101
Tabla 41	Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos y hembras de <i>H. andinus</i> . <i>W</i> representa el estadístico Shapiro-Wilk y <i>p</i> la probabilidad ($\alpha = 0,05$).	102
Tabla 42	Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos de <i>H. andinus</i>	103
Tabla 43	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. andinus</i> .	104
Tabla 44	Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para <i>H. andinus</i> en cada tipo de canto.	106
Tabla 45	Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (<i>mm</i>) para cada especie estudiada.	107
Tabla 46	Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos de las cuatro especies en estudio. <i>W</i> representa el estadístico Shapiro-Wilk y <i>p</i> la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.	108
Tabla 47	Valores de <i>p</i> y <i>F</i> del ANOVA realizado para comparar en morfometría las cuatro especies en estudio.	109
Tabla 48	Valores de <i>p</i> y <i>H</i> del Kruskal-Wallis realizado para comparar en morfometría las cuatro especies en estudio.	109
Tabla 49	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas para las cuatro especies estudiadas: 1. <i>H. cordobae</i> ; 2. <i>H. pulchellus</i> ; 3. <i>H. riojanus</i> ; 4. <i>H. andinus</i> .	112
Tabla 50	Análisis de correlación entre cada variable morfométrica y la latitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies. El asterisco indica la variable cuya relación con la latitud no resultó significativa.	113

Tabla 51	Análisis de correlación entre cada variable morfométrica y la altitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies.	114
Tabla 52	Prueba de normalidad para las variables de eritrometría de 125 individuos de las cuatro especies estudiadas. <i>W</i> representa el estadístico Shapiro-Wilk y <i>p</i> la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.	115
Tabla 53	Valores de <i>p</i> y <i>F</i> del ANOVA realizado para comparar en eritrometría las cuatro especies en estudio.	115
Tabla 54	Valores de <i>p</i> y <i>H</i> del Kruskal-Wallis realizado para comparar en eritrometría las cuatro especies en estudio.	115
Tabla 55	Valores medios de Largo del Eritrocito (<i>A</i>), Largo del Núcleo (<i>a</i>), Ancho del Eritrocito (<i>B</i>), Ancho del Núcleo (<i>b</i>), Área del eritrocito (Área <i>E</i>), Área del Núcleo (Área <i>N</i>), en Relación <i>A/B</i> , Relación <i>a/b</i> .	117
Tabla 56	Resumen estadístico del análisis discriminante basado en Área del eritrocito y el Área del Núcleo de las cuatro especies.	117
Tabla 57	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando el Área de los Eritrocitos y el Área de los Núcleos para las cuatro especies estudiadas: 1. <i>H. cordobae</i> ; 2. <i>H. pulchellus</i> ; 3. <i>H. riojanus</i> ; 4. <i>H. andinus</i> .	118
Tabla 58	Parámetros del complemento cromosómico utilizados para la elaboración del ideograma de <i>H. cordobae</i> y <i>H. pulchellus</i> fórmula cariológica (1:5:6); NF=48.	123
Tabla 59	Distribución de heterocromatina centromérica, pericentromérica, intersticial o telomérica en <i>H. cordobae</i> y <i>H. pulchellus</i> .	124
Tabla 60	Valores promedio de las variables acústicas analizadas para las cuatro especies estudiadas.	126
Tabla 61	Valores de <i>p</i> y <i>F</i> del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de las cuatro especies en estudio.	127
Tabla 62	Resultado del test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las cuatro especies.	127
Tabla 63	Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables acústicas para las cuatro especies estudiadas: 1. <i>H. cordobae</i> ; 2. <i>H. pulchellus</i> ; 3. <i>H. riojanus</i> ; 4. <i>H. andinus</i> .	129
Tabla 64	Análisis de correlación entre cada variable acústica y la latitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies. El asterisco indica la variable cuya relación con la latitud no resultó significativa.	130
Tabla 65	Análisis de correlación entre cada variable acústica y la altitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies. El asterisco indica la variable cuya relación con la latitud no resultó significativa.	131
Tabla 66	Valores de <i>p</i> y <i>F</i> del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de <i>H. cordobae</i> , <i>H. riojanus</i> y <i>H. andinus</i> . El asterisco indica las variables que no	133

mostraron diferencias significativas.

- Tabla 67** Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables acústicas para las cuatro especies estudiadas: 1. *H. cordobae*; 3. *H. riojanus*; 4. *H. andinus*. **134**
- Tabla 68** Datos comparativos de las variable morfométricas de este trabajo con los datos obtenidos por otras fuentes de diferentes poblaciones de *H. andinus*. **137**

ÍNDICE DE FIGURAS

	Títulos	Pág.
Figura 1	Representación esquemática de un anuro mostrando las estructuras involucradas en la vocalización. Extraído de Vitt & Caldwell (2009).	9
Figura 2	Individuo macho de <i>H. pulchellus</i> cantando, con el saco vocal dilatado. Foto: R. Morandi.	9
Figura 3	<i>H. cordobae</i> , vista lateral. Ejemplar machos, Los Tabaquillos. Córdoba.	17
Figura 4	Mapa de distribución para las cuatro especies en estudio. Modificado de Global Amphibian Assessment.	18
Figura 5	<i>H. pulchellus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Las Acequias, Córdoba.	18
Figura 6	<i>H. riojanus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Sañogasta, La Rioja.	20
Figura 7	<i>H. andinus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Amaichá del Valle, Tucumán.	21
Figura 8	Localidades de muestreo para las cuatro especies en estudio. Rojo: <i>H. cordobae</i> ; Azul: <i>H. pulchellus</i> ; Amarillo: <i>H. riojanus</i> ; Verde: <i>H. andinus</i> .	22
Figura 9	Ecoregiones de la Argentina. Brown & Pacheco (2006).	24
Figura 10	Laguna de tipo permanente denominada “Charco de las Brujas”, Río Cuarto.	26
Figura 11	Laguna de tipo permanente, Las Acequias.	26
Figura 12	“Laguna Municipal Juan Carlos Fano”, Alejandro Roca. Foto: J. Valetti.	27
Figura 13	Arroyo, La Carolina, San Luis.	29
Figura 14	Laguna, Pampa de Achala, Córdoba.	30
Figura 15	Balneario Río Achiras, Achiras, Córdoba.	31
Figura 16	Arroyos, Campo experimental Las Guindas, Córdoba.	31
Figura 17	Laguna permanente, Los Tabaquillos, Córdoba. Foto: J. Valetti.	32
Figura 18	Laguna, Los Linderos, Córdoba. Foto: J. Valetti.	32
Figura 19	Vertiente, camping “El Balneario”, Sañogasta, La Rioja.	34
Figura 20	Filtración del Dique “Los Zazos”, Amaichá del Valle, Tucumán.	35
Figura 21	Eritrocitos de <i>H. cordobae</i> . Se indican: <i>A</i> diámetro mayor del eritrocito; <i>B</i> diámetro menor del eritrocito; <i>a</i> diámetro mayor del núcleo y <i>b</i> diámetro menor del núcleo.	38
Figura 22	Oscilograma. Variables temporales.	42
Figura 23	Espectrograma. Variables espectrales.	42
Figura 24	Espectrograma y sonograma de un sonido simple de <i>H. pulchellus</i> .	47
Figura 25	<i>H. cordobae</i> , vista dorsal. Ejemplar machos, Los Tabaquillos. Córdoba.	49

Figura 26	<i>H. cordobae</i> , vista dorsal. Ejemplar machos, Los Tabaquillos. Córdoba. Foto: P. Grenat.	49
Figura 27	Variación morfométrica entre machos y hembras de <i>H. cordobae</i> . El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.	53
Figura 28	Variación del SVL entre poblaciones de <i>H. cordobae</i> . 4. La Carolina; 5. Pampa de Achala; 6. Achiras; 7. Las Guindas; 8. Los Tabaquillos; 9. Los Linderos.	55
Figura 29	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables morfométricas de <i>H. cordobae</i> para las seis poblaciones estudiadas.	55
Figura 30	Regresiones lineales entre el SVL y la latitud de las seis poblaciones estudiadas.	57
Figura 31	Regresiones lineales entre el SVL y la altitud de las seis poblaciones estudiadas.	57
Figura 32	Variación del el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) en las seis poblaciones de <i>H. cordobae</i> estudiadas. 4. La Carolina; 5. Pampa de Achala; 6. Achiras; 7. Las Guindas; 8. Los Tabaquillos; 9. Los Linderos.	59
Figura 33	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el nivel altitudinal de las seis poblaciones estudiadas en <i>H. cordobae</i> .	60
Figura 34	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en <i>H. cordobae</i> .	61
Figura 35	Cariotipos de las poblaciones de <i>H. cordobae</i> estudiadas. a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala. Bar = 10µm.	62
Figura 36	Ideogramas basados en los datos morfométricos de los cariotipos para: a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala.	63
Figura 37	Diacinesis con 12 bivalentes: a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala. Las flechas indican el par de cromosomas 1 con una configuración abierta, en forma de cadena.	65
Figura 38	Meiosis II con 12 cromosomas: a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala.	65
Figura 39	Cariotipo de <i>H. cordobae</i> (Pampa de Achala) con Bando-C.	66
Figura 40	Canto de advertencia de <i>H. cordobae</i> con cantos de tres, cuatro y cinco notas.	68
Figura 41	Variación de la FDC entre poblaciones de <i>H. cordobae</i> . 4. La Carolina; 5. Pampa de Achala; 6. Achiras; 7. Las Guindas; 8. Los Tabaquillos; 9. Los Linderos.	72
Figura 42	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado utilizando las variables acústicas de <i>H. cordobae</i> para las seis poblaciones estudiadas.	73

Figura 43	Regresiones lineales entre la FDC ajustada a 17°C y la latitud de las seis poblaciones estudiadas.	74
Figura 44	Regresiones lineales entre la FDC ajustada a 17°C y la altitud de las seis poblaciones estudiadas.	75
Figura 45	<i>H. pulchellus</i> , vista dorsal. Ejemplar macho, Las Acequias, Córdoba.	76
Figura 46	<i>H. pulchellus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Las Acequias, Córdoba.	76
Figura 47	Variación del SVL entre individuos de las tres poblaciones estudiadas de <i>H. pulchellus</i> . El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.	80
Figura 48	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables morfométricas de <i>H. pulchellus</i> para las tres poblaciones estudiadas.	81
Figura 49	Distribución de los individuos de cada población considerando dos de las variables de mayor peso.	82
Figura 50	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en <i>H. pulchellus</i> .	83
Figura 51	Cariotipo de <i>H. pulchellus</i> para la población de Río Cuarto. Bar = 10µm.	84
Figura 52	Ideograma basado en los datos morfométricos del cariotipo para la localidad de Río Cuarto.	85
Figura 53	a. Diacinesis con 12 bivalentes, Río Cuarto; b. Meiosis II con 12 cromosomas, Alejandro Roca.	85
Figura 54	Cariotipo de <i>H. pulchellus</i> (Río Cuarto) con Bando-C.	86
Figura 55	Canto de advertencia de <i>H. pulchellus</i> con dos notas.	87
Figura 56	Variación de la FDC entre individuos de las tres poblaciones estudiadas de <i>H. pulchellus</i> . El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.	90
Figura 57	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables acústicas de <i>H. pulchellus</i> para las tres poblaciones estudiadas.	91
Figura 58	<i>H. riojanus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Sañogasta, La Rioja.	92
Figura 59	<i>H. riojanus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Sañogasta, La Rioja.	92
Figura 60	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en <i>H. riojanus</i> .	95
Figura 61	a. Diacinesis con 12 bivalentes; b. Meiosis II con 12 cromosomas. Sañogasta.	95
Figura 62	Canto de advertencia de <i>H. riojanus</i> con cantos de tres y cuatro notas.	97
Figura 63	<i>H. andinus</i> , vista dorsal. Ejemplar macho, Amaichá del Valle, Tucumán.	100
Figura 64	<i>H. andinus</i> , vista lateral. Ejemplar macho, Amaichá del Valle, Tucumán.	100

Figura 65	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en <i>H. andinus</i> .	103
Figura 66	a. Diacinesis con 12 bivalentes; b. Meiosis II con 12 cromosomas. Amaichá del Valle.	103
Figura 67	Canto de advertencia de <i>H. andinus</i> con cinco, cuatro y tres notas.	105
Figura 68	Variación del SVL entre las cuatro especies en estudio.	110
Figura 69	Distribución de los individuos de cada especie considerando dos de las variables de mayor peso.	110
Figura 70	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables morfométricas de las cuatro especies estudiadas.	111
Figura 71	Dendograma (método UPGMA) de las relaciones morfométricas entre las cuatro especies estudiadas basado en las distancias de Mahalanobis.	112
Figura 72	Regresiones lineales entre el SVL y la latitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.	113
Figura 73	Regresiones lineales entre el SVL y la altitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.	114
Figura 74	Variación en el tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos medidos en 125 individuos de las cuatro especies estudiadas. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea horizontal muestra el rango y la cruz indica el promedio.	116
Figura 75	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre el Área de los Eritrocitos y el Área de los Núcleos de las cuatro especies estudiadas.	118
Figura 76	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda: $r=0,0446441$, $R^2=0,199\%$, $p=0,6196$) y Área del Núcleo (derecha: $r=0,397446$, $R^2=15,79\%$, $p=0,0000$) versus la altitud de cada población estudiada.	119
Figura 77	Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda: $r=0,368717$, $R^2=13,59\%$, $p=0,0080$) y Área del Núcleo (derecha: $r=-0,0158158$, $R^2=0,025\%$, $p=0,8605$) versus la altitud de cada población estudiada.	119
Figura 78	Regresión lineal entre el SVL y el Área del eritrocito en las cuatro especies estudiadas.	120
Figura 79	Forma de los eritrocitos y sus núcleos. a. <i>H. cordobae</i> ; b. <i>H. pulchellus</i> ; c. <i>H. riojanus</i> ; d. <i>H. andinus</i> .	121
Figura 80	Regresión lineal entre el Área del Eritrocito y el Área del Núcleo.	121
Figura 81	Ideogramas basados en los datos morfométricos de los cariotipos de la Tabla D. A – <i>H. pulchellus</i> ; B – <i>H. cordobae</i> . Las áreas negras indican las Bandas-C.	122
Figura 82	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables acústicas compartidas por las cuatro especies de <i>Hypsiboas</i> en estudio.	128

Figura 83	Regresiones lineales entre la Duración del Canto ajustada a 16°C (izquierda), Frecuencia Dominante (derecha) y la latitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.	130
Figura 84	Regresiones lineales entre la Duración del Canto ajustada a 16°C (izquierda), Frecuencia Dominante (derecha) y la altitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.	131
Figura 85	Dendograma (método UPGMA) de las relaciones acústicas entre las cuatro especies estudiadas basados en las distancias de Mahalanobis.	132
Figura 86	Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables acústicas compartidas por tres de las especies en estudio.	134

RESUMEN

El género *Hypsiboas* Wagler, 1830 cuenta con 84 especies, en su mayoría incluidas en siete grupos. Uno de ellos es el "grupo *pulchella*", que contiene actualmente 36 especies, entre ellas *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841), *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965), *Hypsiboas riojanus* (Koslowsky, 1895) e *Hypsiboas andinus* (Müller, 1926), las cuales se encuentran citadas para la zona central de Argentina. El presente trabajo tiene como objetivo identificar estas especies del género *Hypsiboas* distribuidas en la región central de Argentina mediante la utilización de un complejo de caracteres independientes: morfológicos, citológico (cariometría y eritrometría) y bioacústicos. Las áreas de estudio en las cuales se llevaron a cabo los registros acústicos y la captura de ejemplares de las cuatro especies estudiadas corresponden a la zona central de Argentina (provincias de Córdoba, San Luís, La Rioja y Tucumán): *H. cordobae* Achiras, Los Linderos, Pampa de Achala, Las Guindas, La Carolina, Los Tabaquillos; *H. pulchellus* Río Cuarto, Las Acequias, Alejandro Roca; *H. riojanus* Sañogasta; *H. andinus* Amaichá del Valle. Se relevaron *in vivo* 15 variables morfométricas de 175 individuos adultos en las cuatro especies en estudio. Luego de medir los individuos, se procedió a realizar preparados sanguíneos mediante punción de la vena angularis y frotis sobre portaobjetos; midiendo de 125 ejemplares el diámetro mayor y el diámetro menor de 40 eritrocitos y sus núcleos, a partir de las cuales se calculó el área. Siguiendo las técnicas convencionales se realizó el análisis citogenético de 84 individuos, confeccionando cariotipos, sobre los que se realizaron medidas cartiométricas para la elaboración de ideogramas y determinación de morfología cromosómica. A partir de células en diacinesis y meiosis II se determinó o se corroboró el nivel de ploidía de las especies, analizando también las figuras meióticas. Se analizaron un total de 2374 cantos de 129 individuos, cada serie de cantos fue caracterizada por seis variables temporales y dos variables espectrales. Los análisis realizados con los distintos caracteres independientes permitieron confirmar las diferencias entre las distintas taxas. Morfológicamente, *H. pulchellus* se diferenció de las demás especies por ser de menor tamaño; *H. cordobae* presentó valores intermedios entre *H. pulchellus* y las otras dos especies; mientras que para *H. riojanus* e *H. andinus* los valores mostraron que son similares entre sí, y mayores a las otras dos especies. Los datos morfométricos mostraron una disminución del tamaño corporal en función de la latitud, una variación clinal de norte a sur de disminución del SVL. Además, en este trabajo se observó un incremento en el tamaño corporal en función de la altitud, es decir mayor tamaño corporal a mayor nivel altitudinal. Estos resultados se mostraron tanto en el análisis realizado comparativamente entre las poblaciones de *H. cordobae*, como en el análisis comparativo de las cuatro especie. La eritrometría de las cuatro especies mostró valores similares en tamaño y forma, debido a que el nivel de ploidía de las especies es el mismo; aunque para *H. cordobae*, los eritrocitos fueron mayores, relacionado a las medidas cromosómicas también de mayor tamaño observadas para esta especie. Este carácter también mostró una estructura geográfica en *H. cordobae*, relacionándose el tamaño del eritrocito y la altitud de las localidades muestreadas, en relación a la fisiología de los organismos de acuerdo al nivel altitudinal del ambiente que habita. Para las cuatro especies se determinó el mismo nivel de ploidía $2n = 24$, aunque se observaron diferencias en los largos relativos de los cromosomas y el patrón de bandas-C. Las figuras meióticas observadas para *H. cordobae* e *H. pulchellus* fueron semejante; con diferencias respecto a las figuras meióticas observadas para *H. riojanus*

e *H. andinus*. En cuanto bioacústica, se describió el canto de advertencia de cada una de las especies, evaluando la influencia de la temperatura del aire sobre las variables acústicas. Se pudo diferenciar a *H. pulchellus*, *H. cordobae* e *H. riojanus/H. andinus* (estas dos especies no presentaron diferencias acústicas). Al igual que en morfometría, las diferencias acústicas sugirieron una fuerte estructura geográfica, lo cual fue probado con análisis en relación a la latitud y altitud de las localidades de muestreo, dada posiblemente por las diferencias ambientales de las localidades. Las diferencias morfológicas, de eritrometría, citogenéticas y bioacústicas que se encontraron entre *H. cordobae*, *H. pulchellus*, *H. riojanus* e *H. andinus* apoyan el hecho de que estas cuatro especies sean consideradas especies distintas, y ya no como subespecies de *Hyla pulchella* (ahora *Hypsiboas pulchellus*). Todos los análisis realizados mostraron que *H. riojanus* se encuentra más estrechamente relacionada con *H. andinus*, es decir, no se encontraron diferencias significativas entre estas dos especies, lo que sugiere que éstas podrían ser designadas bajo el mismo nombre. El análisis de los diferentes caracteres independientes permitió diferenciar a *H. cordobae*, *H. pulchellus* y las dos especies Andinas, permitiendo también y apoyar la sinonimia de *H. riojanus* e *H. andinus*, corroborando la clasificación de estas taxas propuesta en recientes trabajos.

ABSTRACT

The genus *Hypsiboas* Wagler, 1830 contains 84 species, most of which are included in seven species groups. One of them is the “*pulchella* group”, which currently contains 36, including *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841), *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965), *Hypsiboas riojanus* (Koslowsky, 1895) and *Hypsiboas andinus* (Müller, 1926), which are known to inhabit the central area of Argentina. The present study aims identify the species of the genus *Hypsiboas* distributed in the central region of Argentina using a complex of independent characters: morphological, cytological (karyometry and erythrocytes size and shape) and bioacoustics. Acoustic recordings and the capture of the four species studied were obtained in several localities the central area of Argentina (Cordoba, San Luis, La Rioja and Tucuman provinces): *H. cordobae* Achiras, Los Linderos, Pampa de Achala, Las Guindas, La Carolina, Los Tabaquillos; *H. pulchellus* Río Cuarto, Las Acequias, Alejandro Roca; *H. riojanus* Sañogasta; *H. andinus* Amaichá del Valle. 15 morphometric variables of 175 adult individuals of four species studied were surveyed *in vivo*. After, blood samples of live specimens were obtained by angularis vein puncture. For each individual (125), the lengths and widths of 40 randomly chosen cells (in addition to their nuclei) were measured. Cytogenetic analyses were carried out on 84, using conventional techniques. Karyotypes were prepared and on the metaphases the chromosomes were measured, the ideograms for each species were elaborated and the chromosome morphology was established. From diakinesis cells and meiosis II was determined or confirmed the ploidy level of the species, also examining meiotic figures. We analyzed 2374 calls from 129 individuals and each call was characterized by six temporal variables and tow spectral variables. Analyses performed with independent characters allowed confirm the differences between different taxa. Morphologically, *H. pulchellus* differed from other species by being smaller, *H. cordobae* presented intermediate values between *H. pulchellus* and the other two species, while for *H. riojanus* and *H. andinus* showed that values are similar, and higher than the other two species. Morphometric data showed a decrease in body size as a function of latitude, clinal variation from north to south decrease in SVL. In addition, this study showed an increase in body size as a function of altitude, larger body size at higher altitudinal level; these results were found in the analysis performed comparatively between populations of *H. cordobae* and in the comparative analysis of the four species. The eritrometría of the four species showed similar values in size and shape, because the four species showed the same chromosome number, although in *H. cordobae* the erythrocytes were higher, related to measures of larger chromosomes also observed for this species. This character also showed a geographical pattern in *H. cordobae*, relating erythrocyte size and altitude of the localities sampled, in relation to the physiology of organisms according to altitudinal level of the environment it inhabits. The four species studied have the same chromosome number $2n = 24$, although there were differences in the relative lengths of chromosomes and C-banding pattern. Meiotic figures observed for *H. cordobae* and *H. pulchellus* were similar, with differences in meiotic figures observed for *H. riojanus* and *H. andinus*. The advertisement call of each species was described and temperature influence on several acoustic variables was evaluated. The advertisement call of *H. pulchellus*, *H. cordobae* and *H. riojanus/H. andinus* was different. As in morphometry, the acoustic differences suggest a strong geographical structure, which was tested with analysis in relation to latitude and altitude of the sampling sites, possibly due to environmental differences in the localities.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Morphological, cytogenetic, bioacoustic and erythrocytes size and shape differences found between *H. cordobae*, *H. pulchellus*, *H. riojanus* and *H. andinus* support the fact that these four species are considered distinct species and not as a subspecies of *Hyla pulchella* (now *Hypsiboas pulchellus*). All analysis showed that *H. riojanus* is most closely related to *H. andinus*, no significant differences between these two species, which followed that they could be designated under the same name. The analysis of different independent character allowed differentiate *H. cordobae*, *H. pulchellus* and two Andean species, and allowing and supporting the synonymy of *H. riojanus* and *H. andinus*, confirming the classification of these taxa proposed in recent work

1. INTRODUCCIÓN

Los anfibios constituyen el primer grupo dentro de los vertebrados en colonizar ambientes terrestres. Éstos organismos son descendientes de tetrápodos que aparecieron por primera vez en el período Devónico, hace alrededor de 400 millones de años (Wells, 2007; Vitt & Caldwell, 2009).

Los anfibios modernos están formados por tres grupos evolutivos, muy diferentes morfológicamente entre sí: 1. las ranas y sapos del orden Anura, son organismos sin cola, con cabeza y ojos grandes, y especializados en el salto; 2. las salamandras (orden Urodela) son más alargadas, con patas delanteras y traseras aproximadamente de igual tamaño y una cola larga y 3. los Cecílidos (orden Gymnophiona), los cuales son organismos que carecen de patas, de cuerpo alargado similar al de una serpiente, los cuales están especializados en la vida bajo tierra (Hickman *et al*, 2007; Zug *et al.*, 2001; Wells, 2007; Collins & Crump, 2009).

El consenso general entre la mayoría de los sistemáticos es que estos tres grupos de anfibios modernos descienden de un ancestro común y por lo tanto forman un clado monofilético, *Lissamphibia*, unidos por una serie de caracteres morfológicos y fisiológicos (Duellman & Trueb, 1994).

Entre estas características podemos mencionar su piel permeable, que permite el paso rápido de agua y gases, además de ser importante en los procesos de respiración, osmoregulación, y de manera limitada en la termorregulación (Duellman & Trueb 1994). Ya que, los anfibios son animales ectotermos (rasgo fisiológico heredado de sus antepasados acuáticos), es decir, incapaces de generar su propio calor corporal. Debido a esto, la temperatura ambiente limita su capacidad para llevar a cabo sus actividades normales, como la alimentación y reproducción, por lo cual en épocas de bajas temperaturas los anfibios se ven obligados a permanecer inactivos durante un período de tiempo (Wells, 2007).

Otra característica importante de los anfibios es su dependencia del agua para la reproducción, ya que los huevos no se encuentran protegidos por una cáscara dura como en aves y reptiles. La reproducción es una de las características más sobresaliente de los anfibios, ya que son únicos entre los tetrápodos en la complejidad de sus ciclos de vida, que combinan una fase acuática y una fase terrestre (Wells, 2007).

Durante la época reproductiva, los machos a través del canto atraen a las hembras; cuando sus óvulos están maduros, las hembras entran al agua y son “abrazadas” por el macho (amplexo). Cuando la hembra descarga los huevos en el agua, el macho libera el esperma sobre ellos para fertilizarlos. El óvulo fecundado comienza su desarrollo casi de inmediato, y se convierten en larvas acuáticas las cuales pasan por una etapa de metamorfosis, que consiste en una importante remodelación de la morfología hasta que finalmente se transforman en adultos terrestres o semiacuáticos (Hickman *et al*, 2007).

De los tres grupos de anfibios modernos, los Anuros son los que presentan mayor número de especies. Arreglos taxonómicos recientes reconocen alrededor de 49 familias, con unos 350 géneros y casi 5966 especies. Sin embargo, incluso entre los especialistas, hay ignorancia sobre la gran diversidad de especies y su gran variedad de estilos de vida; e incluso, el número exacto de las familias varía debido al desacuerdo entre los sistemáticos sobre la manera exacta en que los taxones deben ser arreglados (Wright, 2001; Hickman *et al*, 2007; Wells, 2007; Collins & Crump, 2009; Frost, 2011).

Los Anuros, están presentes en todos los ecosistemas terrestres, a excepción de La Antártida. Habitan tanto ambientes acuáticos y terrestres, desde lagunas y arroyos de las selvas tropicales, pastizales, matorrales de alta montaña, y desiertos. Algunas de las especies son estrictamente acuáticas, mientras que otras están igualmente en tierra o en agua, o se especializan en hábitat terrestres, fosoriales o de vida arbórea. Aproximadamente la mitad de todas las especies conocidas habitan en la zona tropical húmeda (Zug *et al.*, 2001; Wells, 2007; Collins & Crump, 2009, Vitt & Caldwell, 2009).

Durante los últimos 20 años numerosas poblaciones de anfibios han disminuido repentinamente y/o han sufrido reducciones en su hábitat. Los naturalistas y científicos han documentado esta disminución, y el tema ha llegado a considerarse una emergencia ecológica. Las causas de esta disminución incluye la destrucción del hábitat, la introducción de especies exóticas, la contaminación del medio ambiente, el aumento de los rayos ultravioletas y el cambio climático global (Lips *et al.*, 2001; Halliday, 2005; Collins & Crump, 2009).

La idea de que los anfibios, son especialmente susceptibles a la degradación del medio ambiente, deriva de varias de sus características básicas: su piel sumamente permeable, su tamaño relativamente pequeño; su fisiología ectotérmica y su

dependencia a los hábitats acuáticos o húmedos (Vitt *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 2000). Por lo cual, en la actualidad, son promovidos como indicadores fiables de la degradación ambiental (Sun & Narins, 2005).

Para elaborar pautas de manejo y conservación de los Anfibios anuros, se hace indispensable el conocimiento de la biología de las especies, como así también sus aspectos taxómicos y filogenéticos. En la actualidad, tal como lo demuestran diversos trabajos (Heyer & Reid, 2003; Aguiar *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2004, 2005; Salas, 2004), la taxonomía de Anuros, así como también sus relaciones filogenéticas, se basan principalmente en complementar datos morfométricos con un set de datos alternativos que incluyen aspectos moleculares, cromosómicos y bioacústicos. Un claro ejemplo de ello se presenta en “The amphibian tree of life”, publicado por Frost *et al.* (2006), en el cual se realizan modificaciones sustanciales en la clasificación de los anfibios en base a un extenso estudio basado en caracteres moleculares y morfológicos.

1.1 Morfometría

La morfometría es un área fundamental de la investigación en biología que estudia la descripción cuantitativa, análisis, interpretación y variación de la forma. Técnicas de descripción y comparación de la estructura de la forma, son necesarias en cualquier estudio sistemático basado en la morfología de los organismos (Rohlf, 1990; Bernal & Clavijo, 2009).

Dada la importancia del tamaño del cuerpo en la ecología, en las historias de vida y en la aptitud reproductiva de la mayoría de los organismos, los patrones interespecíficos de variación en el tamaño del cuerpo se supone que reflejan los patrones de divergencia adaptativa (Fairbairn, 1997).

Diversas son las explicaciones respecto a estas variaciones en el tamaño corporal de los anfibios. Algunos autores indican que pueden deberse a cuestiones climáticas, debido a que condiciones ambientales extremas podrían imponer que la selección se establezca sobre la morfología, reduciendo o eliminando cambios morfológicos que pueden acompañar a la especiación. Un claro ejemplo de esto es el hecho de que en regiones desérticas los individuos son mayores que aquellos que habitan zonas más húmedas, y estas diferencias pueden ser explicadas como el efecto de la selección

natural contra la desecación (Castellano & Giacoma, 2000; Méndez *et al.*, 2004; Bickford *et al.*, 2007). Mientras tanto, otros autores proponen que el tamaño corporal puede ser reflejo de la edad de los organismos (Castellano & Giacoma, 2000; Rosso *et al.*, 2004).

Además, muchos anfibios muestran diferencias morfológicas externas entre machos y hembras, incluyendo el desarrollo glandular, textura u ornamentaciones de la piel, sacos vocales y coloración (Duellman & Trueb, 1994), y en muchos clados las variaciones interespecíficas en el dimorfismo sexual se correlacionan con el tamaño corporal (Fairbairn, 1997). Particularmente en Anuros, el dimorfismo sexual es un aspecto común de su morfología (Zug *et al.*, 2001), en el cual los machos son de menor tamaño que las hembras (Shine, 1979; Duellman & Trueb, 1994; Bosch & Marquez, 1996; Katsikaros & Shine, 1997; Dandova *et al.*, 1998).

Las características morfológicas de los anuros son particularmente importantes y han servido por muchos años como soporte para abordar y explicar cuestiones evolutivas, taxonómicas y filogenéticas (Barrio, 1965; Cei, 1980; Heyer *et al.*, 1990; Arikan *et al.*, 1998; Castellano *et al.*, 1998; Castellano & Giacoma, 2000; Maneyro & Arrieta, 2000; Sinsch *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2004; Arroyo *et al.*, 2005; Fabrezi, 2006). En particular la morfometría ha permitido en ocasiones descartar o aceptar diferencias sistemáticas existentes entre grupos de individuos que ocupaban un nivel incierto, siendo la consideración de caracteres morfométricos algo usual y útil en los estudios herpetológicos (Salas, 2004).

Sin embargo, al complementar datos morfométrico con datos genético y de canto se ha podido comprobar que especies definidas en base a caracteres morfológicos, encierran en realidad un complejo de especies crípticas (Vences & Wake, 2007; Funk *et al.*, 2008). Incluso, debido a que la especiación no siempre va acompañada por cambios morfológicos, el verdadero número de especies biológicas es probable que sea mayor que la cifra actual de las especies nominales, la mayoría de las cuales son determinadas por caracteres puramente morfológico (Bickford *et al.*, 2007). Por esto, es importante no utilizar solamente datos morfológicos, sino un conjunto de caracteres independientes.

Además, al utilizar técnicas estadísticas multivariadas para analizar caracteres morfométricos, nos permite obtener información consistente para comparar con mayor

precisión las especies y poblaciones, estos aportes metodológicos dentro del campo de la herpetología favorecen a la elucidación de problemas taxonómicos, como por ejemplo los realizados en algunos reptiles (Lobo, 2001; Lobo & Abdala, 2001; Oliver & Lobo, 2002).

1.2 Eritrometría

Debido a su ontogenia, que es única entre los vertebrados, y su modo de vida, los anfibios son populares e interesantes objetos de estudio, incluyendo estudios hematológicos. Por su transición a la vida terrestre los anfibios presentan una serie de estructuras y mecanismos de adaptación, que les ha permitido funcionar en condiciones cambiantes de humedad y presión parcial de oxígeno en ecosistemas acuáticos-terrestres. Estos procesos evolutivos, entre otros, se reflejan en sus eritrocitos grandes, en comparación con los de otros vertebrados (Wojtaszek & Adamowicz, 2003).

Sin embargo, una característica importante en relación a los anfibios, es el conocimiento acerca de su extenso rango en el tamaño de sus eritrocitos (Duellman & Trueb, 1994; Gregory, 2001; Campbell, 2004).

Una causa de esto puede atribuirse a que las células sanguíneas de los anfibios conservan su núcleo, por lo cual, el tamaño de los eritrocitos se correlaciona con el contenido de DNA (Uzzell, 1964; Beçak & Goissis, 1971; Olmo & Morescalchi, 1975, 1978; De Smet, 1981; Horner & MacGregor, 1983; Stöck & Grosse, 1997; Schröer & Greven, 1998; Cianciarullo *et al.*, 2000). Esto ha llevado a que diversos autores planteen la utilización del tamaño de los eritrocitos como una herramienta para comparar especies relacionadas con diferente nivel de ploidía (Atatür *et al.*, 1999; Martino & Sinch, 2002; Grenat, 2006; Gao *et al.*, 2007; Grenat *et al.*, 2009a, b; Valetti *et al.*, 2009), ya que es una metodología simple, rápida y mínimamente invasiva (Grenat *et al.*, 2009a).

Esta relación ha sido también discutida en base a las diferencias en las tasas metabólicas entre los diferentes grupos de vertebrados (Gregory, 2000), ya que el tamaño y la forma de los glóbulos rojos son indicadores de la superficie disponible para el intercambio gaseoso en la función respiratoria (Hartman & Lessler, 1964; Sevinç *et al.*, 2000). La disponibilidad de oxígeno limita las posibilidades metabólicas y, por lo

tanto, del comportamiento de los animales en un ambiente concreto. Frente a esto, la adaptación a un medio depende del desarrollo de mecanismos adecuados para superar estas limitaciones, aún con un costo energético adicional. Por lo cual, no es extraño que en anfibios, dichas adaptaciones afecten a las propiedades respiratorias de su sangre y a aquellos parámetros que más inciden en éstas (Martínez *et al.*, 1985).

Las variaciones en el recuento y tamaño de los eritrocitos en base a la actividad metabólica en anfibios han sido registradas por diversos investigadores, indicando que aquellas especies más activas muestran eritrocitos de menor tamaño, mientras que las que presentan menor consumo de oxígeno muestran eritrocitos más grandes (Atatür *et al.*, 1998; Atatür *et al.*, 1999; Arserim & Mermer, 2008). Además algunos autores han remarcado que diversos factores ambientales, como la temperatura, pueden influir en el tamaño de los eritrocitos (Haden, 1940; Altman & Dittmer, 1961; Harris, 1963; Moye *et al.*, 1969).

Estudios recientes han demostrado una correlación entre el tamaño del cuerpo (largo hocico-cloaca) y el tamaño de los eritrocitos en salamandras (Davis, 2008; Davis *et al.*, 2009), sin embargo esta relación ha sido poco investigada en anuros.

Diversos autores han estudiado la hematología de los anfibios, la mayoría de estos estudios hacen referencia al conteo de células sanguíneas (Atatür *et al.*, 1998; Atatür *et al.*, 1999; Zhelev *et al.*, 2006; Dönmez *et al.*, 2009), aunque existen trabajos que reportan acerca del tamaño de las mismas en algunas especies (Hartman & Lessler, 1964; Matson, 1990; Atatür *et al.*, 1998, 1999, 2001; Gao *et al.*, 2007; Grenat *et al.*, 2009a,b). Sin embargo, debido a la importancia del tamaño de los eritrocitos en diferentes aspectos de la vida de los anuros, es relevante realizar estudios hematológicos relacionados al tamaño y forma de los glóbulos rojos de las diferentes especies.

1.3 Citogenética

En general, los anuros muestran características morfológicas conservadas, lo cual dificulta el uso de estos caracteres en investigaciones de taxonomía y filogenia (Hillis, 1991) por lo cual se hace necesario la utilización de otras metodologías.

Desde que en 1888 fue introducido el termino cromosoma, por Wilhelm Waldeyer, y a comienzos del siglo XX se elaboró la teoría de la herencia cromosómica,

elaborada por Theodore Boveri, Walter Sutton y Thomas Morgan, el estudio de los cromosomas conocido como Cariología o Citogenética, fue ocupando un lugar destacado en la Genética, tanto en aplicaciones clínicas como académicas, al igual que los estudios comparativos en biología y en filogenia (Sessions, 1996).

El uso de técnicas convencionales de teñido cromosómico, que han permitido la identificación de características morfológicas de los cromosomas como son el número, forma, tamaño, presencia de constricciones secundarias, etc., que en conjunto conforman el cariotipo, han proporcionado nuevos datos útiles para distinguir especies y géneros, y son suficientes también para la reevaluación de cuestiones relacionadas a la taxonomía y sistemática de anuros (Rodríguez Piazzese, 1995; Miura, 1995; Córdova, 1999; Lourenço *et al.*, 1999; Busin *et al.*, 2001; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; da Cruz de Campos & Kasahara, 2006; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008).

Numerosos autores han proporcionado mediante citogenética, información relevante para abordar cuestiones en la sistemática de los anfibios anuros (Busin *et al.*, 2001, 2006, 2008; Aguiar *et al.*, 2002, 2004; Ananias *et al.*; 2006; Lourenço *et al.*; 2008). Además, los análisis de cariotipos no solo han sido utilizados por los sistemáticos para la formulación de las hipótesis más rigurosas sobre la filogenia de algunos grupos, sino también ha sido utilizada por los citogenetistas para interpretar los reordenamientos cromosómicos incorporados en el curso de la historia evolutiva (Aguiar *et al.*, 2002).

Entre las técnicas de citogenética utilizadas, el bandeo cromosómico ha incrementado la cantidad y calidad de la información obtenida con objetivos taxonómicos, permitiendo dar mayor precisión a las inferencias que de ello derivan (Schmid, 1978a; Green & Sessions, 1991; Córdova, 1999).

La identificación de marcadores citológicos puede ser una herramienta importante para taxonomía y sistemática, sobre todo en los grupos con la morfología externa conservadora y con cariotipos muy homogéneos (King, 1990; Zampieri Silva *et al.*, 2006). La heterocromatina constitutiva en cromosomas de anuros presentan un patrón de distribución con alta variabilidad (Schmid 1978a, b) y el bandeo-C ha sido utilizado para diferenciar cariotipos muy similares (Miura 1995; Formas & Cuevas, 2000; Cuevas & Formas, 2003).

La proliferación de nuevas técnicas y su continuo refinamiento han permitido a los genetistas hacer nuevas observaciones y han conducido a una mejor comprensión de los procesos en la evolución génica (Dullman & Trueb, 1994).

1.4 Bioacústica

Cada organismo interactúa constantemente con otros organismos, ya sea de la misma especie y en ocasiones entre individuos de diferentes especies. Estas interacciones sociales requieren alguna forma de comunicación; en anfibios y reptiles se comunican a través de una variedad de sentidos: visual, químicos, acústicos y táctiles. (Barrio, 1969; Wycherley *et al.*, 2002; Vitt & Caldwell, 2009).

Particularmente en anuros, la comunicación acústica es una importante característica de su comportamiento social (McClelland *et al.*, 1996; Pargana *et al.*, 2003; Márquez *et al.*, 2005a, b).

El mecanismo básico de producción de sonido en la mayoría de los anuros es un sistema relativamente simple. El sonido es generado por las cuerdas vocales que se encuentran en la laringe; el aparato laríngeo está localizado entre los pulmones y la cavidad bucal, usando unas estructuras como caja de resonancia que se encuentran en el piso de la boca de los machos, denominados sacos vocales. Durante el ciclo respiratorio, antes de comenzar el canto, el aire entra por las narinas, la laringe se abre, y el aire pasa a los pulmones. Luego, con las fosas nasales cerradas, los músculos del cuerpo se contraen, empujando un impulso de aire a través de la laringe, provocando que las cuerdas vocales vibren y de allí por los orificios del piso de la boca hacia los sacos vocales que se inflan, permitiendo que el sonido se irradie hacia fuera y resuene en ellos (Vitt & Caldwell, 2009, Dullman & Trueb, 1994) (Figuras 1 y 2).

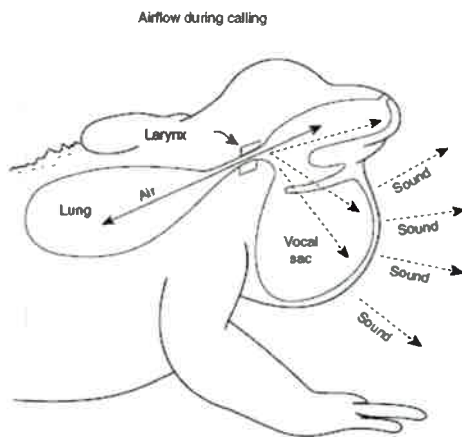


Figura 1. Representación esquemática de un anuro mostrando las estructuras involucradas en la vocalización. Extraído de Vitt & Caldwell (2009).



Figura 2. Individuo macho de *H. pulchellus* cantando, con el saco vocal dilatado. Foto: R. Morandi.

Cada especie de anuro tiene distintas vocalizaciones y la mayor parte de las especies son capaces de producir una serie diversa de sonidos vinculados con distintas actividades biológicas, dependiendo del comportamiento en el que esté comprometido el individuo en ese momento (Barrio, 1964; Brzoska *et al.*, 1982; Dickerson, 1986; Bush, 1997; Duré *et al.*, 2003; Vitt & Caldwell, 2009).

Diversos autores (Barrio, 1964; Wells, 1977; Cei, 1980; Ryan, 1985; Basso & Basso, 1992; Duellman & Trueb, 1994; Wells, 2007) proporcionan una clasificación de los distintos tipos de cantos y sus funciones, la que se puede sintetizar de la siguiente manera:

- Canto de advertencia (*“mating call”*): señales acústicas emitidas por los machos en época reproductiva, que tiene como función la atracción de la hembra.
- Canto de liberación (*release call*): señal acústica producida por el macho o la hembra en respuesta al *amplexus*.
- Canto de lluvia (*rain call*): emisión de canto provocado por cambios climáticos, especialmente las precipitaciones.
- Grito de angustia (*distress call*): sonidos agudos y persistentes emitidos por ciertos anuros cuando son capturados por animales predadores.
- Canto agresivo (*aggressive calls*): es emitido por aquellas especies con temperamento agresivo al momento en que son atacados o al ser molestados.

- Canto territorial (*territorial call*): canto que advierte a machos de la misma o de otra especie la ocupación de un territorio.

- Canto de alerta (*warning signal*): consisten en ciertas vocalizaciones o sonidos dirigidos a aquellos que se encuentran en su vecindad para alertarlos sobre la presencia de predadores.

La vocalización más conocida es el canto de advertencia, una señal especie-específica emitida por los machos, que tiene como función atraer a la hembra (Bush, 1997; Penna & Veloso, 1987; Duré *et al.*, 2003; Bosch & De la Riva, 2004). Así, los machos de muchas especies cada noche durante las estaciones reproductivas emiten cantos, y las hembras seleccionan a los machos en base a las características de esos cantos (Brenowitz & Rose, 1999; Witte *et al.*, 2001; Bee, 2002; Friedl & Klump, 2005; Bernal *et al.*, 2007b). Diversos estudios han mostrado que las hembras son capaces de distinguir entre cantos que tienen una fina diferencia estructural y/o temporal en sus propiedades; importante para reconocer especies y además obtener información sobre las características de su posible pareja. Los parámetros acústicos preferidos por las hembras varía entre especies, y en algunas especies se cree son indicadores indirectos del fitness genético del macho (Penna & Veloso, 1987; Bush, 1997; Castellano & Giacoma, 2000; Friedl & Klump, 2005; Smith & Roberts, 2003).

En consecuencia, el hecho de que cada especie presente un canto característico hace que los parámetros del canto puedan reflejar un mecanismo de aislamiento reproductivo entre especies (Kanamadi *et al.*, 2002), por lo que el estudio del canto de advertencia es una herramienta sumamente utilizada para esclarecer problemáticas taxonómicas y filogenéticas, además de ser utilizado como un rasgo fundamental para la identificación de especies (Blair, 1958; Basso & Basso, 1987; Penna & Veloso, 1987; Vasara *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1993; Márquez *et al.*, 1993; Márquez, 1995; di Tada *et al.*, 1996a; Köhler & Lötters, 1998; Salas *et al.*, 1998; Guimarães & Bastos, 2003; Marquez & Bosch 2003; Pombal & Bastos, 2003; Bernal *et al.*, 2004; Silva-Filho & Juncá, 2006). Además, las comparaciones del canto de advertencia inter e intraespecíficas también han sido utilizadas para analizar la influencia de la variación geográfica y no el establecimiento de patrones filogenéticos (Cocroft & Ryan, 1995; Bionda *et al.*, 2006; Baraquet *et al.*, 2007).

Debido a la estrecha dependencia que presentan los anuros a las condiciones ambientales, es indispensable considerar en forma conjunta los datos climáticos con los datos de actividad (Crump, 1994). Por su condición de ectotermos, es de esperar que las propiedades acústicas varíen con la temperatura y otras variables climáticas (Duellman & Trueb, 1994).

Las especies de anuros se caracterizan por una estructura acústica básica cuya variabilidad depende de numerosos factores, cabría esperar que bajo diferentes condiciones ambientales ciertas propiedades estructurales del canto difieran entre poblaciones alopátricas de manera constante (Barrio, 1964; Gerhardt, 1991; Ryan & Wilczynski, 1991; di Tada *et al.*, 1996).

Además, las propiedades del canto de los anuros esta influenciado por factores ambientales tales como el fotoperíodo, la humedad relativa y la temperatura ambiente; varios estudios lo han demostrado (Vasara *et al.*, 1991; Heyer, 1994; Martino & Sinsch, 2002; Guimarães & Bastos, 2003; Bosch & De la Riva, 2004; Bionda *et al.*, 2006; Almeida-Gomes *et al.*, 2007; Baraquet *et al.*, 2007; Bionda *et al.*, 2008), por ello, es importante que al realizar análisis acústicos se explore cuantitativamente el efecto de la temperatura sobre las diferentes variables acústicas.

Esta influencia ambiental en la estructura del canto sugiere que poblaciones de una misma especie, con distribución geográfica diferente, y por lo tanto con diferentes condiciones climáticas, presentarán diferencias significativas al comparar los parámetros de sus cantos. Este carácter etoecológico, así como también los patrones de coloración y diseño, constituyen aspectos importantes del fenotipo que se modifican con la variación geográfica (Mayr, 1942; Barrio, 1965; Cei, 1980; Hasegawa *et al.*, 1999; Cairo & di Tada, 2005).

Teniendo en cuenta que cada animal tiene características acústicas propias de su especie, y que estas características responden a su entorno ambiental y social, se hace necesario caracterizar el canto de los anuros a fin de que los mismos sirvan de apoyo en estudios taxonómicos y filogenéticos.

1.5 Las especies en estudio

Hypsiboas es un género perteneciente a la familia *Hylidae*, revalidado por Faivovich *et al.* (2005). En dicha revisión, estos autores removieron un total de setenta especies previamente asignadas al género *Hyla*, asignándolas al género *Hypsiboas*; entre esas especies las pertenecientes al “grupo *pulchella*”.

Este grupo se encuentra representado por 36 especies descritas (Frost, 2011; Köhler *et al.*, 2010; Lehr *et al.*, 2010; Lehr *et al.*, 2011) de las cuales cuatro se encuentran citadas por diferentes autores para la zona central de Argentina: *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841), *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965), *Hypsiboas riojanus* (Koslowsky, 1895) e *Hypsiboas andinus* (Müller, 1926) (Barrio, 1962, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Bridarolli & di Tada, 1994; di Tada *et al.*, 1996b; Avila *et al.*, 1999; Koscinski *et al.*, 2008; Köhler, 2010).

Hypsiboas pulchellus, es un anfibio de amplia distribución, extendiéndose desde Santa Catalina al sur de Brasil, Uruguay y Argentina. En nuestro país abarca las provincias de Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, La Pampa, Chaco, norte de Río Negro, Córdoba y Buenos Aires (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1974, 1987; Basso, 1990; Martori & Avila, 1992; di Tada, 1999, Kwet, *et al.*, 2004).

Su especie hermana, *H. cordobae* se localiza en las Sierras de Córdoba y San Luis, desconociéndose con precisión los límites de su área de distribución, sobre todo en la zona de contacto con *H. pulchellus* (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo 1987; Bridarolli & di Tada, 1994; Stuart, 2006). Las diferencias morfológicas y en la estructura del canto de advertencia (Barrio, 1962; 1965; Cei, 1980; Basso & Basso, 1987; Gallardo, 1987) son los suficientemente fuertes para considerarlas como dos especies diferentes (Faivovich *et al.*, 2004).

Las especies *H. riojanus* e *H. andinus* se encuentran presentes en las provincias de Catamarca y La Rioja, extendiéndose a las provincias Jujuy, Salta y Tucumán para el caso de *H. andinus* (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Bridarolli & di Tada, 1994). Al igual que *H. pulchellus* e *H. cordobae*, *H. riojanus* e *H. andinus* son dos especies hermanas, y su relación no está clara (Faivovich *et al.*, 2004; Koscinski *et al.*, 2008). Ambas son morfológicamente muy similares, al igual que en su vocalización (Faivovich *et al.*, 2005). La única característica morfológica para distinguirlas es una banda dorso lateral blanca o crema que comienza detrás del ojo en *H. andinus* (Cei,

1980; Faivovich *et al.*, 2004), pero la amplia variabilidad en el patrón de coloración de ésta demuestra que no es una característica diagnóstica confiable (Koscinski *et al.*, 2008). Diversos autores remarcan la variabilidad interpoblacional en diversos aspectos (comportamiento larval, morfología externa y larval, anatomía del condrocráneo, canto de advertencia) de *H. andinus* (Lavilla, 1984; Lavilla & Fabrezi, 1987; Márquez *et al.*, 1993; De la Riva *et al.*, 2000; Langone & Lavilla, 2002), y muchos dejan claro que su situación taxonómica no está bien establecida (Duellman *et al.*, 1997; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Koscinski *et al.*, 2008). De La Riva *et al.* (2000) afirman que futuros estudios pueden demostrar que existe más de una especie incluida bajo el nombre específico de *Hypsiboas andinus*.

Varios trabajos realizados sobre estas especies hacen referencia al área de distribución de algunas taxa o corroboran la presencia de estas (Barrio, 1962, 1965; Ceí, 1980; Gallardo, 1974, 1987; Basso, 1990; Martori & Avila, 1992; Bridarolli & di Tada, 1994; di Tada *et al.*, 1996b; di Tada, 1999; Kwet, *et al.*, 2004; Stuart, 2006), sin embargo, se desconoce con precisión los límites de separación de cada una.

La morfología de adultos de estas cuatro especies se encuentra disponible en Ceí (1980), Gallardo (1974) y Gallardo (1987). Sin embargo, la utilización de caracteres morfométricos utilizando análisis estadísticos multivariados, que permitan distinguir los mencionados taxa no ha sido realizada hasta el presente.

La descripción de la hematología de las cuatro especies estudiadas no ha sido realizada hasta el presente, encontrándose solo trabajos que hacen referencia a la utilización del test de micronúcleos en eritrocitos con el fin de desarrollar un modelo experimental para la detección de efectos genotóxicos, utilizando a *H. pulchellus* como especie modelo (Lajmanovich *et al.*, 2005).

Respecto a la citogenética, existen pocos datos sobre las especies asociadas con el grupo de *H. pulchellus*. Morescalchi (1973) y King (1990) solo muestran el número cromosómico de las especies; mientras que Ananías (1996) y Ananías *et al.* (2004) estudiaron el cariotipo, el patrón de heterocromatina y la distribución de la región organizadoras del nucleolo de algunas especies del “grupo *pulchella*”.

Además, existen escasas referencias acerca de los diferentes aspectos del canto de advertencia, y en dichos trabajos solo se describen los mismos (Barrio, 1962, 1965; Ceí, 1980; Basso & Basso, 1987; di Tada *et al.*, 1996a; Salas *et al.*, 1998), pero ninguno de

ellos explora cuantitativamente el efecto de la temperatura sobre las diferentes variables del canto. Por lo que se hace necesario un muestreo de cantos de advertencia a un gradiente amplio de temperaturas, para la aplicación de estadística multivariada requerida para la distinción de especies basada en variables bioacústicas cuantitativas.

1.6 Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Identificar los diferentes taxa y relevar la diversidad de especies del género *Hypsiboas* en la región central de Argentina, mediante la utilización de un complejo de caracteres independientes: morfológicos (morfométricos), citológico (cariometría y eritrometría) y etológicos (bioacústicos).

1.6.2. Objetivos Específicos

- Relevar las diferentes especies del género *Hypsiboas* presentes en el área central de Argentina.
- Caracterizar, describir y comparar la exomorfología de las especies del género *Hypsiboas*.
- Describir y comparar las características cromosómicas de cada una de las especies.
- Caracterizar, analizar y comparar la eritrometría de las especies en estudio.
- Describir el canto de advertencia de cada una de las especies, evaluando la influencia de la temperatura del aire, sobre las variables acústicas.
- Examinar las divergencias acústicas entre las distintas especies de *Hypsiboas* estudiadas.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Taxonomía de las especies en estudio

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

Orden Anura Fischer von Waldhein, 1813

Familia Hylidae Rafinesque, 1815

Subfamilia Hyalinae Rafinesque, 1815

Genero *Hypsiboas* Wagler, 1830

Especie *Hypsiboas cordobae* Barrio, 1965

Hypsiboas pulchellus Duméril & Bibron, 1841

Hypsiboas riojanus Koslowsky, 1895

Hypsiboas andinus Müller, 1926

Hylidae es una de las familias más numerosas en especies entre los anfibios. Con 885 especies y 57 géneros actualmente reconocidos, contiene aproximadamente el 13% del total de los anfibios (Wiens *et al.*, 2010). En los últimos años esta familia ha sido estudiada, progresando considerablemente en la resolución de sus problemáticas filogenéticas (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2006; Wiens *et al.*, 2010).

El género *Hypsiboas* Wagler, 1830 contiene 84 especies, que en su mayoría se encuentran incluidas en siete grupos. Uno de ellos es el grupo *Hypsiboas pulchellus* el cual cuenta con 36 especies distribuidas en las regiones Andinas de Perú, Bolivia y Argentina, entre los 500 a 3416 m.s.n.m., así como también en regiones montañosas de Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay (Köhler *et al.*, 2010; Lehr *et al.*, 2010; Frost, 2011; Lehr *et al.*, 2011).

Para Argentina, este género cuenta con un total de 11 especies de las cuales cuatro se encuentran citadas por diferentes autores para la zona central de Argentina: *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841), *Hypsiboas cordobae* (Barrio, 1965), *Hypsiboas riojanus* (Koslowsky, 1895) e *Hypsiboas andinus* (Müller, 1926) (Barrio,

1962, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Bridarolli & di Tada, 1994; di Tada *et al.*, 1996b; Avila *et al.*, 1999; Koscinski *et al.*, 2008; Köhler, 2010).

Barrio (1965) estudió en detalle estas especies, centrándose en lo que él consideraba una sola especie politípica, *Hyla pulchella* con cinco subespecies: *Hyla pulchella andina* L. Müller, 1924; *Hyla p. cordobae* Barrio, 1965; *Hyla p. riojana* Koslowsky, 1895; *Hyla pulchella prasina* Burmeister, 1856, y la subespecie nominal.

Más tarde, Lutz (1968) añadió *Hyla pulchella joaquini* B. Lutz, 1968, y en un trabajo posterior (Lutz, 1973) otorga estatus específico a *Hyla p. prasina*.

Duellman *et al.* (1997) realizaron una completa revisión taxonómica de poblaciones Andinas del “grupo *pulchella*”, basándose en caracteres bioacústicos y morfométricos, en la cual se realizó una caracterización, descripción y redescipción de seis especies andinas, redefiniendo el “grupo *pulchella*” y elevando a rango específico a *H. andinus*. Por su parte, Faivovich *et al.* (2004), realizaron un análisis filogenético del grupo basado en secuencias de cuatro genes de DNA mitocondrial, incluyendo 10 de las 14 especies ya consideradas, además de entidades del grupo *Hyla polytaenia* y de varios otros grupos. En éste trabajo también se adjudicó *status* específico a *H. cordobae* e *H. riojana*.

En una nueva revisión, Faivovich *et al.* (2005), resurge el género *Hypsiboas* Wagler 1830, para todas las especies formalmente incluidas en los grupos de *Hyla albopunctata*, *H. boans*, *H. geographica*, *H. granosa*, *H. pulchella*, e *H. punctata*, el complejo *H. albomarginata*, y varias especies no asignadas a un grupo en particular.

2.2. Descripción de las especies

La descripción de cada especie en particular se basa en las observaciones a campo realizadas y la recopilación de información de trabajos de diversos autores (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1974, 1987; Basso, 1990; Duellman *et al.*, 1997; Salas *et al.*, 1998; di Tada, 1999; Langone & Lavilla, 2002; Faivovich *et al.*, 2004; Kwet, *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Stuart, 2006; Koscinski *et al.*, 2008).

2.2.1. *Hypsiboas cordobae*

Hypsiboas cordobae es una especie de tamaño pequeño (39-50 mm), siendo el ancho de su cabeza algo mayor que su longitud. Posee el pliegue timpánico acentuado y prepollex de los machos más desarrollado que en *H. pulchellus*.

En cuanto a su coloración, el dorso puede variar desde el pardo canela al verde, liso o con un manchado dorsal particular (Figura 3). Las bandas laterales están ausentes, tanto en los flancos como en las extremidades, con una leve insinuación en el reborde timpánico.

Habita en arroyos y ríos de las zonas serranas, vive entre pajonales y vegetación periacuática, siendo frecuente encontrarla sobre piedras en las horas de mayor insolación. Esta especie emite su canto desde la vegetación de la orilla, pero a diferencia de *H. pulchellus*, puede hacerlo también parcialmente sumergida en el agua.

Sus ciclos reproductivos son casi continuos, encontrándose formas larvales durante la primavera y verano e incluso en otoño e invierno.



Figura 3. *H. cordobae*, vista lateral. Ejemplar machos, Los Tabaquillos. Córdoba.

Se distribuye por las sierras de Córdoba y San Luís, desconociéndose con precisión los límites de su área, sobre todo en la zona de contacto con *H. pulchellus* (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Stuart, 2006) (Figura 4).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

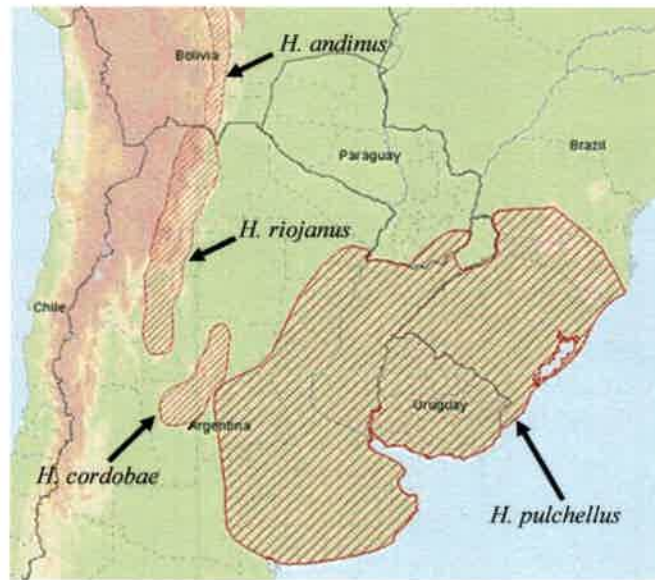


Figura 4. Mapa de distribución para las cuatro especies en estudio. Modificado de Global Amphibian Assessment.

2.2.2. *Hypsiboas pulchellus*

Hypsiboas pulchellus, conocida vulgarmente como “rana del zarzal” es también una especie de tamaño pequeño (37-50 mm) (Figura 5). Se caracteriza por su rostro de contorno semicircular, con cabeza tan ancha como larga. Presenta ojos grandes, tímpano bien visible y pliegue supratimpánico evidente.



Figura 5. *H. pulchellus*, vista lateral. Ejemplar macho, Las Acequias, Córdoba.

Los machos poseen plex rudimentario y saco vocal medio; la piel del dorso es lisa; con delgada cadena glandular por detrás del tímpano, líneas glandulares en antebrazos y tibias, y vientre granular.

Las coloraciones generales son sumamente variadas, aunque las más frecuentes son la parda amarillenta (canela) y la verde. Cei (1980), Gallardo (1987) y di Tada (1999) describen la coloración como dorso verde grisáceo o amarronado, liso o con manchas oscuras diluidas; línea blanca desde el párpado superior, la cual se ensancha en los flancos, y desaparece en la ingle; banda amarronada que va desde el canto rostral, a través del ojo, cubre el labio inferior y llega a la axila; la ingle, la superficie anterior del fémur y la axila presentan manchas oscuras redondeadas; fémur posterior violeta claro pálido con manchas negras; vientre amarillento o blancuzco.

Habita en lagunas temporarias o semipermanentes, en ambientes de bosquecillos y herbáceas de la región Pampeana y del Espinal. Se caracteriza por permanecer oculta durante el día entre la vegetación, aunque puede ser observada inmóvil tomando sol sobre troncos de árboles, pasando inadvertida debido a su coloración críptica. Emite su canto fuera del agua, en la orilla o bien sobre la vegetación circundante al cuerpo de agua.

El periodo de actividad de los adultos comienza a fines de agosto hasta los primeros días de mayo; siendo su actividad diaria nocturna y crepuscular.

La reproducción no está regulada por las lluvias ocasionales, como sucede en otros anfibios. Las oviposiciones son de pocos huevos, colocados en una masa globosa, quedando sumergidos en el agua y adheridos a plantas acuáticas. La etapa de desarrollo larval es de un mes y medio (cohorte de septiembre-octubre) a seis meses (cohorte de abril a mayo)

Esta especie posee una amplia distribución (Figura 4), extendiéndose desde Santa Catalina al sur de Brasil, Uruguay y Argentina. En nuestro país abarca las provincias de Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, La Pampa, Chaco, norte de Río Negro, Córdoba, y Buenos Aires (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1974, 1987; Basso, 1990; Salas *et al.*, 1998; di Tada, 1999, Kwet, *et al.*, 2004).

2.2.3. *Hypsiboas riojanus*

H. riojanus, junto a *H. andinus*, son de mayor tamaño a las dos especies anteriores (48-56 mm). El ancho de su cabeza es superior a su longitud, y posee un notable reborde timpánico, bien contorneado.

El prepollex de los machos se encuentra considerablemente desarrollado, con una espina larga e incurvada, lo que hace de esto un carácter distintivo no solo de esta especie sino también de *H. andinus*.

La coloración puede variar entre el verde claro y el gris oscuro, o pueden tomar un color amarronado. En ocasiones presentan manchas redondeadas no confluentes en el dorso. Las bandas laterales están ausentes tanto en flancos como en extremidades (Figura 6).

Habitan en bordes de arroyos de montaña, y emite su canto desde piedras o flotando sobre la superficie del agua amarrados a la vegetación.

Su distribución abarca las provincias de La Rioja y Catamarca (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987) (Figura 4).



Figura 6. *H. riojanus*, vista lateral. Ejemplar macho, Sañogasta, La Rioja.

2.2.4. *Hypsiboas andinus*

Hypsiboas andinus es similar a *H. riojanus*, su tamaño oscila entre los 47mm y 60mm (Figura 7). El ancho de su cabeza es mayor que su longitud, y el reborde timpánico es también muy notorio. El prepollex, como ya se explicó, es muy desarrollado al igual que en la especie anterior.

En cuanto a coloración, también puede variar entre el verde amarillento al gris oscuro, pudiendo aparecer el manchado más oscuro en el dorso, rojo ladrillo, bronce, o manchas más oscuras de colores tierra (Barrio, 1965; Duellman *et al.*, 1997; Langone & Lavilla, 2002).

Habita en zonas de montaña, a bajas temperaturas; y sus puestas y huevos también soportan bajas temperaturas. Se encuentra siempre en cercanías de los cuerpos de agua, ya sean cuerpos de agua lóticos o lénticos. Durante el día, los individuos suelen encontrarse en la vegetación, árboles o arbustos, aledaños a los cuerpos de agua, sobre hierbas o bajo piedras; o al sol directo, asoleándose. Suelen saltar dentro del agua cuando son perturbados durante el día. Por la noche los machos cantan sobre ramas, piedras, o en el suelo, en las orilla de los cuerpos de agua, en charcas poco profundas o arroyos (Duellman *et al.*, 1997).

Hypsiboas andinus es un taxón de amplia distribución, en la región andina y subandina del noroeste de Argentina (provincias de Catamarca, Tucumán, Salta y Jujuy) y Bolivia (alcanzando Cochabamba), donde ocupa hábitats diversos (forestados, abiertos, en márgenes de sistemas lénticos o lóticos, etc.) entre los 500 metros y los 3550 metros sobre el nivel del mar (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Duellman *et al.*, 1997; Langone & Lavilla, 2002) (Figura 4).



Figura 7. *H. andinus*, vista lateral. Ejemplar macho, Amaichá del Valle, Tucumán.

Hypsiboas andinus e *H. riojanus* presentan entre sí grandes afinidades, ambas son morfológicamente muy similares, se diferencian fundamentalmente en el manchado

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

característico de *H. riojanus* y en la falta de bandas laterales de ésta, pero la amplia variabilidad en el patrón de coloración de éstas especies demuestra, como ya se explico, que no es una característica diagnóstica confiable (Barrio, 1965; Cei, 1980; Duellman *et al.*, 1997; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Koscinski *et al.*, 2008).

2.3. Áreas de muestreo

Las áreas de estudio en las cuales se llevaron a cabo los registros acústicos y la captura de ejemplares de las cuatro especies estudiadas corresponden a la zona central de Argentina (provincias de Córdoba, San Luis, La Rioja y Tucumán): *H. cordobae* Achiras, Los Linderos, Pampa de Achala, Las Guindas, La Carolina, Los Tabaquillos; *H. pulchellus* Río Cuarto, Las Acequias y Alejandro Roca; *H. riojanus* Sañogasta; *H. andinus* Amaichá del Valle. Las mismas se encuentran detalladas en la Figura 8 y Tabla 1.

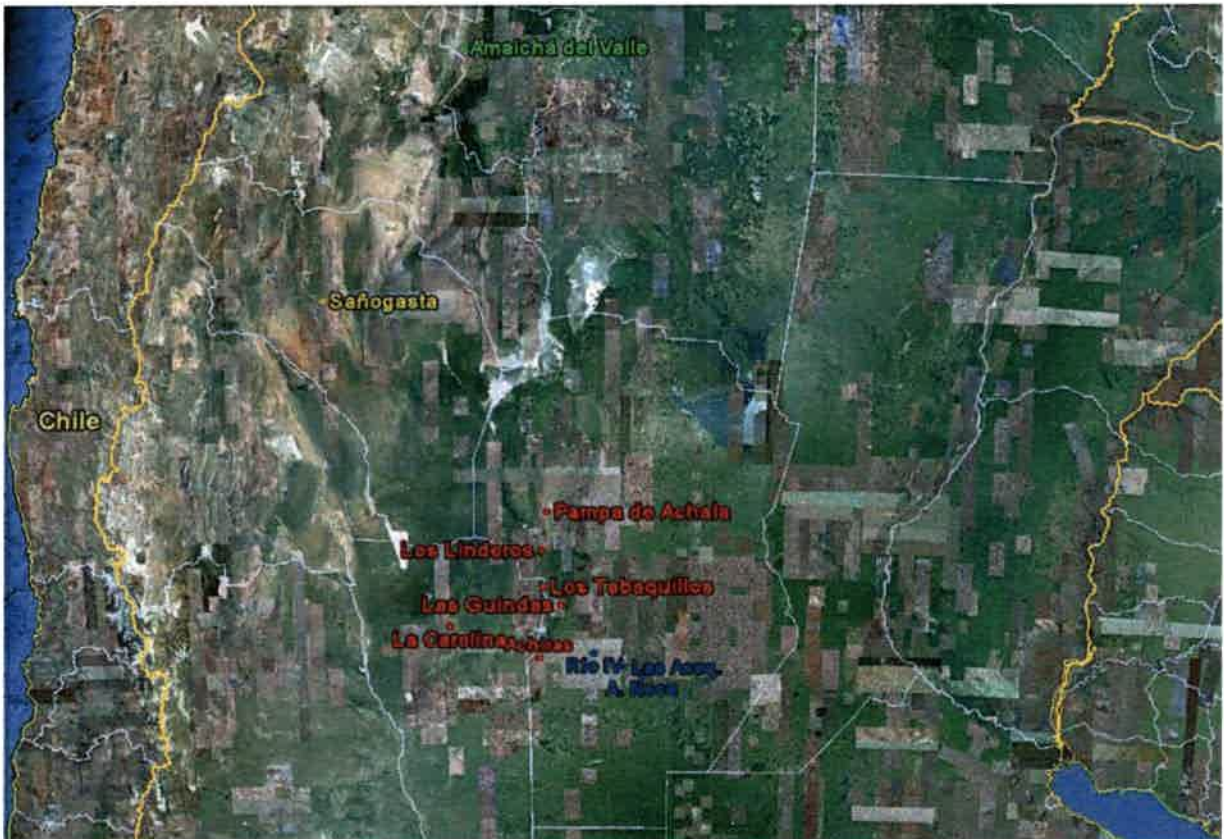


Figura 8. Localidades de muestreo para las cuatro especies en estudio. Rojo: *H. cordobae*; Azul: *H. pulchellus*; Amarillo: *H. riojanus*; Verde: *H. andinus*.

Tabla 1. Especies y sitios de muestreo donde se realizaron los registros acústicos, el relevamiento de variables ambientales y la colecta de ejemplares adultos. N=167.

Especie	N	Sexo	Localidad	Sitio	Latitud S Longitud O	Altitud	Provincia
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	18	♂	Río Cuarto	Lagua permanente "Charca Las Brujas" U.N.R.C.	33° 06' 40.78" 64° 18' 16.88"	420 m.s.n.m.	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	15	♂	Alejandro Roca	Laguna Municipal "Intendente Juan Carlos Fano"-Reserva Recreativa Natural	33° 21' 06" 63° 42' 10"	206 m.s.n.m.	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	17	♂	Las Acequias	Laguna permanente. Campo privado	33° 15' 26.16" 63° 55' 15.10"	269 m.s.n.m.	Córdoba
<i>Hypsiboas cordobae</i>	12	♂	La Carolina	Arroyo	32° 48' 43.94" 66° 05' 48.15"	1634 m.s.n.m.	San Luis
	4	3 ♂ 1 ♀		La Posta	31° 36' 47" 64° 52' 29"		
<i>H. cordobae</i>	5	♂	Pampa de Achala	Arroyo "Mal Paso"	31° 48' 35.8" 64° 21' 32.8"	2150 m.s.n.m	Córdoba
	7	2 ♂ 5 ♀		Arroyo	31° 49' 41.8" 64° 51' 44.9"		
<i>H. cordobae</i>	14	13 ♂ 1 ♀	Achiras	Río Achiras	33° 09' 28.64" 64° 58' 55.13"	808 m.s.n.m.	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	28	25 ♂ 3 ♀	Campo experimental Las Guindas, Alpa Corral	Arroyo	32° 35' 35.22" 64° 42' 38.92"	930 m.s.n.m.	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	12	7 ♂ 4 ♀	Establecimiento Los Tabaquillos	Laguna	32° 23' 59.75" 64° 55' 33.69"	2107 m.s.n.m.	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	5	♂	Cerro Los Linderos	Laguna	32° 00' 54.05" 64° 56' 42.97"	2310 m.s.n.m.	Córdoba
<i>Hypsiboas riojanus</i>	18	17 ♂ 1 ♀	Sañogasta	Vertiente. Camping Municipal "El Balneario"	29° 19' 20" 67° 35' 32"	1200 m.s.n.m.	La Rioja
<i>Hypsiboas andinus</i>	12	11 ♂ 1 ♀	Amaichá del Valle	Dique "Los Zazos"	26° 37' 34.4" 65° 52' 15.6"	2194 m.s.n.m.	Tucumán

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Estas áreas muestran características variadas, por eso a continuación se describen teniendo en cuenta las Ecoregiones Argentinas propuestas por Brown *et al.* (2006).

Entre las 18 ecoregiones descritas por estos autores (Figura 9), las áreas de muestreo se encuentran dispuestas en dos de ellas (Chaco y Espinal), ambas bosques xerófilos (Brown *et al.*, 2006).

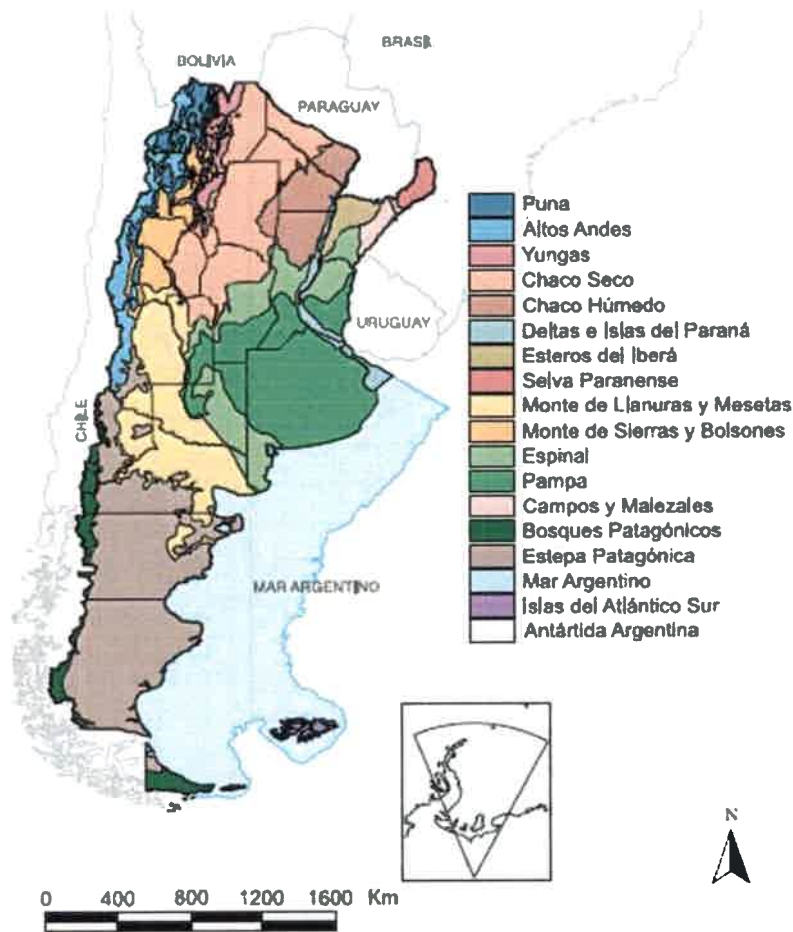


Figura 9. Ecoregiones de la Argentina. Brown & Pacheco (2006).

Las tres localidades en las cuales se realizó el muestreo para *H. pulchellus* (Río Cuarto, Las Acequias y Alejandro Roca) se encuentran al sur de la provincia de Córdoba (Figura 8). Estas localidades pertenecen a la ecoregión del Espinal. Analizado desde el punto de vista de las especies arbóreas, el Espinal está caracterizado por el género *Prosopis* (algarrobos, ñandubay, caldén) y entre sus arbustos *Acacia caven* (espinillo), aunque incluye asociaciones de especies muy diferentes entre sí. En cuanto a la geomorfología, esta región se encuentra en una planicie medanosa, por lo que pueden

encontrarse algunas especies vegetales asociadas a la fijación de médanos, tales como *Panicum urvelleanum* (tupe) y *Hyalis argentes* (olivillo). El Espinal rodea a la región pampeana por el norte, el oeste y el sudoeste. Está en contacto con los bosques paranaenses, los bosques fluviales del Paraná y el Uruguay, el Chaco Oriental y Occidental, el Chaco Árido y el Monte. En cada una de esas diversas regiones se encuentran vegetaciones transicionales con el Espinal, por lo que resulta fácil imaginar la diversidad de situaciones incluidas en esta ecorregión (Luti *et al.*, 1979; Bridarolli & di Tada, 1996; Arturi, 2006).

Durante los últimos años (2003, 2004 y 2005), se evaluó el estado de fragmentación y conservación de los remanentes de bosques de extensos sectores de Córdoba correspondientes a lo que fuera la Provincia del Espinal. Se observó que estos bosques están prácticamente desapareciendo y que su área está muy fragmentada (Lewis *et al.*, 2006).

La región se caracteriza por tener clima semiseco, con tendencia a semihúmedo de las planicies; presentando pequeñas deficiencias de agua (hasta 100mm), con invierno térmico de llanura y de piedemonte. Las lluvias máximas ocurren durante el período octubre-marzo, con una media anual de 784mm y un período de mínimas entre abril y septiembre. La masa de aire se caracteriza por ser cálida y húmeda con temperatura media anual de 18°C (Capitanelli, 1979a; Bridarolli & di Tada, 1996). La fisiología del área de estudio corresponde a llanuras suavemente onduladas con un gradiente promedio de pendiente de 1,5%; esta escasa pendiente favorece el estancamiento de las aguas, sumado el aporte subterráneo que contribuye, junto con las precipitaciones, a mantener cursos de agua permanentes (Bridarolli & di Tada, 1996). Los suelos en general se encuentran bien drenados, de textura franco arenosa fina y con elevada susceptibilidad a la erosión hídrica (Capitanelli, 1979b).

En la localidad de Río Cuarto, el sitio de muestreo está ubicado en Campus Universitario, perteneciente a la Universidad Nacional de Río Cuarto, Departamento de Río Cuarto, donde se encuentra una pequeña laguna de tipo permanente (localmente denominada “Charco de las Brujas”) y charcos temporarios próximos (Figura 10).

La laguna permanente es abastecida por las escorrentías de aguas provenientes de desagües pluviales, lo que produce una marcada estacionalidad en la variación del nivel del agua. Está cubierta por pastizales y formaciones boscosas de árboles autóctonos e

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

introducidos (Doffo, 1989), sobre los márgenes se encuentran relictos del espinal como el “espinillo” (*Acacia caven*), el “chañar” (*Geoffroea docorticans*), el “tala” (*Celtis tala*) y el “moradillo” (*Schinus fasciculatus* var *arenicola*) entre otros, y además algunos bosques exóticos de “olmos” (*Ulmus pumila*), “acacias blancas” (*Robinia pseudoacacia*) y “eucaliptos” (*Eucalyptus globulus*); ejemplares predominantes en la costa sur, mientras que en la costa norte predominan los pastizales. Además, la laguna está siendo colonizada por especies palustres como “juncos” (*Junco sp.*) y ciperáceas (De Angelo, 2003; Bionda, 2004; Baraquet *et al.*, 2006).



Figura 10. Laguna de tipo permanente denominada “Charco de las Brujas”, Río Cuarto.

En la Localidad de Las Acequias, se muestreo en una laguna permanente, ubicada dentro de un campo privado. Esta laguna presenta a su alrededor pastizal, y en su interior está colonizada por gran cantidad de “juncos” (*Junco sp.*) (Figura 11).



Figura 11. Laguna de tipo permanente, Las Acequias.

Por último, la localidad de Alejandro, perteneciente al departamento Juárez Celman, ubicada en la llanura anegadiza, que se caracteriza por la escasa altitud y suaves pendientes, por lo cual la red de drenaje es desorganizada; incluso, el río que pasa por su proximidad, el Río Cuarto, debido a la escasa pendiente tiende a formar bañados. Al Noreste de la localidad se encuentra la Reserva Recreativa Natural denominada “Laguna Municipal Juan Carlos Fano”, la cual cuenta con 42 hectáreas, de las cuales 16 están representadas por un cuerpo de agua permanente (Figuras 12). Esta laguna responde a un ambiente de paleocauce, sistema de meandros abandonados, y tiene como abastecimiento el drenaje de agua de las calles del pueblo durante los días de lluvia (Valetti, 2003).



Figura 12. “Laguna Municipal Juan Carlos Fano”, Alejandro Roca. Foto: J. Valetti.

En cuanto a las seis localidades de muestreo para la especie *H. cordobae*, a excepción de La Carolina, perteneciente a la provincia de San Luis, las demás localidades pertenecen a la provincia de Córdoba.

Las seis localidades forman parte de la Ecoregión Chaco Seco. Esta ecoregión es, en su mayor parte, una vasta llanura sedimentaria, modelada esencialmente por la acción de los ríos que la atraviesan en sentido noroeste-sudeste. Sus altas cuencas se encuentran fuera de la región, en la cordillera, desde donde transportan una gran cantidad de sedimentos que forman albardones a los costados del cauce o, como ocurre con frecuencia, colmatan los cauces y dan origen a la divagación de los ríos (Torrella & Adámoli, 2006).

El fuego es un importante factor que actúa como modelador del paisaje a nivel regional. Su acción tiene un rol fundamental en el equilibrio dinámico que existe entre las especies leñosas y las herbáceas. Es el responsable de numerosos parches de pastizal que salpican la matriz boscosa, parches que persisten sólo si el fuego es recurrente; son los llamados pastizales pirógenos, y las gramíneas más importantes en ellos son el pasto crespo (*Trichloris sp.*), los sorguillos (*Gouinia sp.*) y la cola de zorro (*Setaria argentina*). El fuego también es manipulado por el hombre con fines de manejo, para favorecer el rebrote del pasto del que se alimenta el ganado, para facilitar la caza y para eliminar áreas boscosas con fines agrícolas (Torrella & Adámoli, 2006).

Dentro del Chaco Seco se pueden distinguir tres subregiones, según sus condiciones climáticas: Chaco Semiárido, Chaco Serrano y Chaco Árido. Para las localidades en estudio, La Carolina corresponde a la subregión Chaco Árido, la cual ocupa el sudoeste de la región: el este de Catamarca y La Rioja, el norte de San Luis, el noroeste de Córdoba y el sudoeste de Santiago del Estero. Está prácticamente rodeado por sierras, lo que le confiere características particulares ya que, al actuar como barrera, restringe fuertemente las precipitaciones en esta subregión. Las cuencas que se forman son autóctonas y endorreicas (no desagotan agua fuera de la región), y la evapotranspiración es superior al aporte de agua. La salinidad de los suelos condiciona la vegetación y, según las condiciones particulares, se encuentran distintos tipos de arbustales, muchas veces dominados por el jume (*Suaeda sp.* y *Allenrolfea sp.*), con presencia de elementos más típicos de la ecorregión del Monte, tales como las jarillas (*Larrea sp.*). En los suelos altos menos salinos aparece el bosque xerófilo característico de la región, incluso con el quebracho colorado santiagueño (Torrella & Adámoli, 2006).

Las demás localidades corresponden al Chaco Serrano, el cual forma la mayor parte del límite oeste de la región, que en este tramo limita con las Yungas y el Monte, y ocupa sectores de las provincias de Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Luis y Córdoba. Está formado por elementos de las Sierras Pampeanas y las áreas más bajas de las Sierras Subandinas. En el extremo occidental del Chaco Semiárido las sierras constituyen una barrera orográfica para los vientos húmedos del este, lo que provoca mayores precipitaciones en las laderas orientales y climas más secos hacia el oeste. Este factor y la variación térmica asociada a la altura establecen particulares condiciones

climáticas que determinan el desarrollo de la vegetación. En general, el bosque serrano está dominado por el horco-quebracho (*Schinopsis hanckeana*), junto con el molle de beber (*Lithrea molleoides*), especialmente en el sur, y por gran cantidad de cactáceas y leguminosas espinosas en el norte. En el estrato arbustivo y herbáceo aparecen varias especies de otros distritos biogeográficos. A mayor altitud, el bosque es reemplazado por pastizales o estepas gramíneas con predominio de especies de los géneros *Stipa* y *Festuca* (Torrella & Adámoli, 2006).

El sitio de muestreo La Carolina, es un pequeño pueblo del Departamento Coronel Pringles, provincia de San Luis, que se sitúa a 80 Km al Norte de la Ciudad Capital, sobre la base del Cerro Tomolasta. Su orografía la constituye una serie de escarpados cerros de origen volcánico cuyas alturas van desde los 1500 a los 2000 m.s.n.m. La hidrografía de la zona corresponde a la cuenca del Río Quinto y está representada por arroyos y ríos de pequeño caudal. Son reconocidos los ríos: La Carpa, Arroyo La Carolina, Río Las Invernadas como portadores de las tan codiciadas tierras auríferas; los dos últimos confluyen formando las nacientes del Río Grande el cual recorre gran parte de la cara este de las sierras centrales de San Luis sumando vertientes y arroyos para desembocar en el Dique Antonio Esteban Agüero. La localidad en sí se encuentra encerrada en la cuña de dos arroyos, en los cuales se realizaron los muestreos (Figura 13).



Figura 13. Arroyo, La Carolina, San Luis.

Las demás localidades muestran una geomorfología similar, ya que forman parte de las Sierras Grandes de la provincia de Córdoba, que, como su nombre lo indica, son

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

las más elevadas y las de mayor extensión latitudinal. Posee una extensión de 300 km de longitud por 50 o 60 km de ancho, encontrándose aquí las mayores alturas de la provincia de Córdoba: el Cerro Champaquí, de 2884 m.s.n.m. y Los Gigantes de 2382 m.s.n.m. las cuales dividen a las Sierras Grandes en tres sectores: Sierras de Comechingones, la cual es un cordón homogéneo con cumbres de importancia como Oveja de 2206 m.s.n.m., Uspara de 1620 m.s.n.m. y El Moro de 1390 m.s.n.m. En esta formación se diferencia claramente las laderas occidental y oriental, la primera es escarpada y la segunda posee suaves pendientes. Las Sierras de Achala, estructuralmente formada por granito y mostrando una ladera occidental escarpada; al norte del Cerro Los Gigantes, los ríos separan serranías como la de Characate de 1450 m.s.n.m., la cual culmina en la confluencia de los ríos Pinto y San Gregorio, otra serranía de 2000 m.s.n.m. se sitúa entre los ríos Candelaria y Soto llegando hasta Cruz del Eje; y la cadena Gaspar que termina cerca de Villa Soto. Y por último, las Sierras del Norte (Bridarolli & di Tada, 1996).

Pampa de Achala (Sierras Achala), es un área delimitada en su límite norte por el cerro Los Gigantes, culminando con el cerro Champaquí en su extremo sur. Cubre una extensión de 65 km de largo por 8 km de ancho, y es recorrida por cursos de agua con profundas quebradas de difícil acceso (Bridarolli & di Tada, 1996). En ésta gran área, los muestreos se realizaron en tres arroyos diferentes, cuyas coordenadas geográficas se muestran en la Tabla 1 (Figura 14).



Figura 14. Laguna, Pampa de Achala, Córdoba.
Foto: J. Valetti.

La localidad de Achiras, situada en el departamento Río Cuarto, es parte de las últimas estribaciones de de las Sierras de Comechingones. Su río, de singular caudal cuenta con un piletón que alcanza una profundidad de 2.5 mts, sitio en el cual se realizaron los muestreos (Figuras 15).



Figura 15. Balneario Río Achiras, Achiras, Córdoba.

El campo experimental Las Guindas, perteneciente a la Universidad Nacional Río Cuarto, se encuentra ubicado al sur del departamento de Calamuchita, al noroeste de Alpa Corral dentro de la pedanía Río de los Sauces, abarcando una superficie de 1200ha. El área se ubica en las Sierras de Comechingones (Natale, 1999). En esta localidad los muestreos se realizaron en el Río de los Sauces, que cruza la región, y en diversos arroyos (Figura 16).



Figura 16. Arroyos, Campo experimental Las Guindas, Córdoba.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Los Tabaquillos, es una estancia privada, ubicada en el departamento Calamuchita, perteneciendo también a las Sierras de Comechingones, limitando con la provincia de San Luis. Aquí el sitio de muestreo fue una laguna de tipo permanente (Figura 17).



Figura 17. Laguna permanente, Los Tabaquillos, Córdoba. Foto: M. Ottero.

El Cerro Los Linderos, también pertenece a las Sierras de Comechingones, ubicado próximo al cerro Champaquí, a unos 40 km de Yacanto. En este sitio los muestreos se realizaron en una laguna de tipo permanente (Figura 18).



Figura 18. Laguna, Los Linderos, Córdoba. Foto: J. Valetti.

El sitio en la cual se realizaron los muestreos para *H. riojanus*, Sañogasta, es una localidad perteneciente al departamento Chilecito, en la provincia de La Rioja; localizada en el km 3.849 de la Ruta Nacional 40, a unos 10 km al oeste de Nonogasta, y a 25 km de Chilecito.

Esta localidad pertenece a la ecoregión del Monte, la cual se extiende latitudinalmente en forma de faja al este de la cordillera de los Andes, comienza en Salta y Jujuy, y se ensancha hasta el Océano Atlántico en Río Negro y Chubut, de modo que recorre más de 2.000 km. Dentro de esta gran extensión se han descrito dos ecorregiones que se diferencian principalmente por sus características geomorfológicas: el Monte de Sierras y Bolsones, que abarca la zona norte hasta el sur de San Juan, y el Monte de Llanuras y Mesetas, que comprende desde el sur de San Juan hasta Chubut. El clima es cálido y seco, con gran variedad térmica diaria y entre estaciones, aunque es notable la isoterminia a lo largo del gradiente latitudinal, si se considera que abarca 20°C y la temperatura media anual sólo varía entre 13,4°C en Trelew y 17,5°C en Tinogasta. Las precipitaciones muestran un marcado gradiente este-oeste y son muy variables: entre 80 mm y alrededor de 300 mm anuales, aunque en pocos lugares superan los 200 mm. La estación seca dura hasta un máximo de nueve meses y las lluvias están restringidas al verano, excepto en el sur, donde tienden a distribuirse más regularmente a lo largo del año. El tipo de vegetación predominante es la estepa arbustiva alta, caracterizada mayormente por la comunidad del jarillal, con presencia de cactáceas columnares o cardones y bosques de algarrobos en algunas zonas. La cobertura herbácea es muy variable y depende fuertemente de las precipitaciones y del impacto de la ganadería (Pol *et al.*, 2006).

Particularmente, Sañogasta se encuentra específicamente en Monte de Sierras y Bolsones. La geografía de esta zona presenta gran variedad de estructuras geomorfológicas y de altitud. Hacia el oeste limita con la Puna y los Altos Andes, y ocupa bolsones y laderas bajas. Entre los 24° 35' y los 27° de latitud sur se observan exclusivamente valles longitudinales que se continúan hacia el sur por cuencas cerradas (bolsones) y por valles intermontanos (Pol *et al.*, 2006).

En este sitio los muestreos se realizaron en una vertiente que recorre el camping "El Balneario" (Figura 19).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina



Figura 19. Vertiente, camping “El Balneario”, Sañogasta, La Rioja.

Para *H. andinus*, el sitio de muestreo fue la localidad de Amaichá del valle, ubicada en el departamento Tafi del Valle, en el noroeste de la provincia de Tucumán, a 57 km de la cabecera departamental. Está situada en el sector correspondiente a la provincia de Tucumán de los Valles Calchaquíes.

Esta localidad pertenece a la ecoregión Altos Andes, formando parte del Parque Provincial Cumbres Calchaquíes, área protegida más grande con que cuenta la provincia, comprendiendo una superficie aproximada de 40.000 ha. Los Altos Andes son, en general, todos los espacios montañosos por encima de los 3.500 m de altura, aunque hacia el sur este límite desciende hasta los 2.500 m y aun menos. El relieve es montañoso, quebrado, con valles profundos y usualmente marcados por la actividad glacial, con abundantes morrenas. La altura es el factor ambiental más importante, pues controla las temperaturas y las precipitaciones. Las primeras nunca son elevadas, siendo frecuentes los descensos por debajo del nivel de congelación, aún en verano. La amplitud térmica es importante, sobre todo en verano. Del mismo modo, las escasas precipitaciones son en forma de nieve durante buena parte del año. Estas condiciones básicas de baja temperatura y precipitación no permiten la formación de una cobertura vegetal densa ni la formación de suelos completos. La vegetación básicamente está formada por arbustos bajos, leñosos y en forma de colchón, muy adaptados a las condiciones locales con una copa densa, hojas pequeñas y un gran desarrollo radicular, como el cuerno de una cabra. Las gramíneas más comunes son el iro (*Festuca ortophyllia*), el coirón (*Stipa chrysophylla*) y más al sur del huecú (*Poa holciformis*).

Dado su aislamiento y la rigurosidad de clima, es un ambiente relativamente poco alterado (se podría pensar que es el menos modificado del país) (Reboratti, 2006).

En este sitio los muestreos fueron realizados en el dique “Los Zazos”, el cual es alimentado por el Río Amaicha y se encuentra ubicado a sólo 7 Km. del centro de Amaicha del Valle. En una pared del dique se observan filtraciones, formando pequeños hilos de agua, en donde se observaron los individuos de la especie cantando (Figura 20).



Figura 20. Filtración del Dique “Los Zazos”, Amaichá del Valle, Tucumán.

2.4. Procedimientos de campo

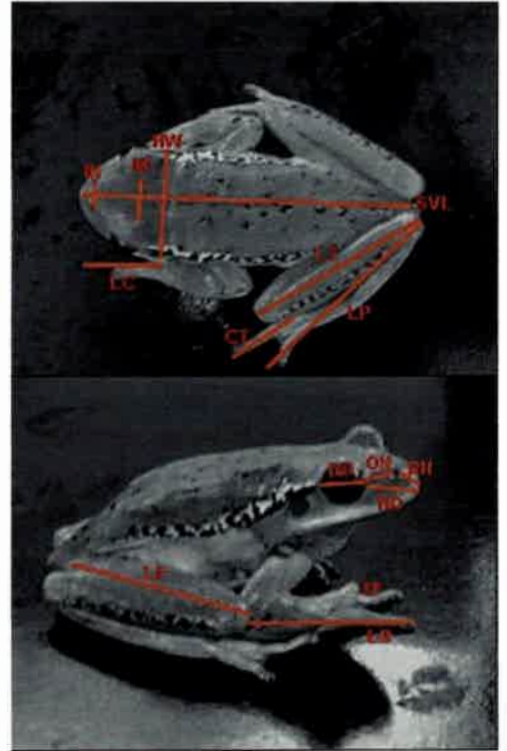
El muestreo se realizó durante los meses de septiembre a mayo (coincidente con el período reproductivo de las especies en las áreas de estudio) de 2006 a 2011. Los registros acústicos y capturas se realizaron durante las horas del atardecer hasta el amanecer (19 a 6 hs), con grabador digital Olympus VN-3100PC. Inmediatamente después de cada grabación se procedió a capturar al individuo y relevar con termómetro digital las temperaturas del aire, agua y sustrato del microhábitat en el cual el individuo se encontraba efectivamente cantado.

2.5 Procedimientos de laboratorio

2.5.1. Morfología externa de los adultos: La morfometría de las diferentes especies se caracterizó en base a 15 variables morfométricas (Cei, 1980; Heyer *et al.*, 1990; Martino & Sinsch, 2002), las cuales fueron relevadas *in vivo* en individuos adultos de las cuatro especies en estudio. Las medidas fueron realizadas mediante el uso de calibre digital Mahr 16ES con precisión 0,01 mm:

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

- (1) largo hocico-cloaca (SVL)
- (2) anchura máxima de la cabeza (HW)
- (3) largo de la cabeza (LC)
- (4) distancia hocico-ojo (HO)
- (5) distancia internarinas (IN)
- (6) distancia interocular (IO)
- (7) distancia ojo-narina (ON)
- (8) distancia rostro-narina (RN)
- (9) diámetro del ojo (DO)
- (10) largo del brazo (LB)
- (11) largo del tercer dígito (lado interno) anterior (TF)
- (12) largo del fémur (LF)
- (13) largo de la tibia (LT)
- (14) largo de la pata (LP)
- (15) largo del cuarto dígito (lado interno) posterior (CT)



Para cada especie, con los datos de las medidas relevadas se obtuvieron medias, desvíos, máximos y mínimos de cada variable; para cada población y en general para cada especie. Se probó la normalidad de los datos en las 15 variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se realizaron comparaciones entre machos y hembras respecto a la morfometría, mediante ANOVA en los datos con distribución normal y mediante ANOVA de Kruskal-Wallis en los casos en que la normalidad fue rechazada.

En *H. pulchellus*, para la comparación entre poblaciones se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

- Se probó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk.
- ANOVA en los datos con distribución normal y Kruskal-Wallis en los casos en que la normalidad fue rechazada.
- Si el resultado fue significativo se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para determinar que poblaciones o especies son diferentes.

- Análisis discriminante para obtener una medida adicional de la diferenciación morfológica entre poblaciones o entre especies (Sinsch & Schneider, 1999).

Para los análisis comparativos entre poblaciones en *H. cordobae*, y para el análisis comparativo entre las cuatro especies los análisis estadísticos fueron:

- Se probó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk
- ANOVA en los datos con distribución normal y Kruskal-Wallis en los casos en que la normalidad fue rechazada.
- Si el resultado fue significativo se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para determinar que poblaciones o especies son diferentes.
- Análisis discriminante para obtener una medida adicional de la diferenciación morfológica entre poblaciones o entre especies (Sinsch & Schneider, 1999).
- Se realizaron regresiones simples entre las variables morfométricas la latitud y altitud de cada localidad.
- En *H. cordobae*, a partir del análisis discriminante realizado se calcularon las diferencias morfométricas entre las seis poblaciones con las distancias de Mahalanobis. Para evaluar la asociación entre las distancias geográficas (en kilómetros) y las distancias morfométricas (distancias de Mahalanobis) se realizó el test de Mantel utilizando MANTEL para Windows 1.18 (Cavalcanti, 2005).
- Para el análisis entre especies, mediante el uso de la matriz de distancias cuadradas de Mahalanobis se realizó un análisis de agrupamiento (Cluster Análisis) utilizando el método de ligamento promedio no ponderado (UPGMA) con el objetivo de analizar el grado de relación entre las cuatro especies analizadas.

2.5.2. Eritrometría: luego de medir los diferentes individuos, se procedió a realizar preparados sanguíneos de cada ejemplar mediante punción de la vena angularis (Nöller, 1959) y frotis sobre portaobjetos, dejándolos secar a temperatura ambiente. Los preparados fueron observados con microscopio Zeiss Axiophot-Axiolab. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital AxioCam HRc Zeiss y programa Axio Vision 4.3.

Los archivos fotográficos obtenidos como imagen Tiff, fueron utilizados para registrar las medidas de los eritrocitos, con el programa Adobe® Fotoshop® 9.0. Se

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

midió el diámetro mayor (A) y el diámetro menor (B) de 40 eritrocito elegidos al azar por individuo, así como el diámetro mayor (a) y el diámetro menor (b) de sus núcleos (Figura 21).

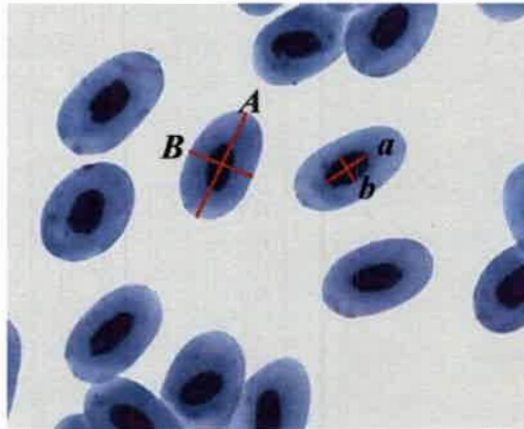


Figura 21. Eritrocitos de *H. cordobae*. Se indican: *A* diámetro mayor del eritrocito; *B* diámetro menor del eritrocito; *a* diámetro mayor del núcleo y *b* diámetro menor del núcleo.

Para obtener el valor real de los eritrocitos, a las imágenes fotografiadas se les colocó una escala de 20 μm , la cual luego fue medida con el programa Adobe® Photoshop® 9.0 (31mm). Luego en base a los valores obtenidos para el diámetro mayor (A) y el diámetro menor (B) de los eritrocito y el diámetro mayor (a) y el diámetro menor (b) de sus núcleos, se realizó la conversión mediante regla de tres simple.

Para el cálculo de la superficie de los eritrocitos y de sus núcleos se asumió una forma elipsoide y se calcularon sus áreas mediante la fórmula del área de un elipse ($AB\pi/4$, donde *A* es el diámetro mayor y *B* es el diámetro menor) para luego obtener las áreas promedios por individuo (Martino & Sinsch, 2002).

Además del tamaño de los eritrocitos y sus núcleos, para evaluar la forma de los mismos se calculó la relación entre el diámetro mayor y el diámetro menor, lo que indica cuan redondeados son (RE y RN respectivamente).

Se calcularon medias y desvíos del largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos de cada especie para machos y hembras; en base a los cuales se realizó un análisis de ANOVA para comparar la eritrometría entre sexos.

Se calcularon también medias y desvíos de las medidas de tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos de los individuos analizados, por localidad y un promedio general de cada especie.

Para los análisis comparativos entre poblaciones en *H. cordobae* e *H. pulchellus*, y para el análisis comparativo entre las cuatro especies los análisis estadísticos fueron:

- Se probó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk
- ANOVA en los datos con distribución normal y Kruskal-Wallis en los casos en que la normalidad fue rechazada, realizado con Área de los Eritrocitos y Área de los Núcleos.
- Análisis discriminante para obtener una medida adicional de la diferenciación en Área de los Eritrocitos y Área de los Núcleos, entre poblaciones o entre especies (Sinsch & Schneider, 1999).
- Se realizaron regresiones simples entre Área de los Eritrocitos o el Área de los Núcleos y la altitud de cada localidad, sólo en *H. cordobae* y en la comparación entre especies.
- A fin de evaluar si el tamaño de los eritrocitos se relaciona al tamaño corporal se realizó un análisis de correlación entre el área de los eritrocitos y el largo hocico-cloaca, y entre el área del núcleo de los eritrocitos y el largo hocico-cloaca.

2.5.3. Citogenética: fueron procesados un total de 84 individuos (35 ejemplares de *H. cordobae*; 29 ejemplares de *H. pulchellus*; 12 ejemplares de *H. riojanus*; 8 ejemplares de *H. andinus*).

Para el análisis citogenético los animales fueron inoculados ocho horas antes de ser sacrificados con colchicina 0,3% inyectada intraperitonealmente con una dosificación de 0,1 ml/10gr de individuo. Los extendidos de cromosomas fueron preparados a partir de suspensiones de testículos e intestinos luego del tratamiento con citrato de sodio al 1% posteriormente se probó la hipotonía con agua destilada. Los tejidos fueron fijados con una solución de 3:1 de metanol-ácido acético. Las tinciones convencionales se realizaron con Giemsa 10% en pH 6,8 buffer-fosfato durante 10 minutos. Todas estas técnicas se realizaron siguiendo los métodos descriptos en los trabajos de Schmid, 1978a, b; Schmid *et al.*, 1979 y Salas, 2006. Los preparados una vez listos fueron observados con microscopio Zeiss Axiophot-Axiolab, relevando las

imágenes mediante el uso de cámara digital Axiocam HRc Zeiss y programa Axio Vision 4.3. Las imágenes fueron archivadas en formato Tiff, reelaboradas mediante el uso de Adobe® Fotoshop® 9.0 para la confección de los correspondientes cariotipos.

A partir de células en metafase se confeccionaron los cariotipos; y a partir de células en diacinesis y meiosis II se determinó o se corroboró el nivel de ploidía de las especies, analizando también las figuras meióticas.

Sobre las metafases se midió la longitud de los cuatro brazos cromosómicos empleando el programa Adobe® Fotoshop® 9.0. Las medidas obtenidas para cada metafase se procesaron en hoja de cálculo Excel 2000, para obtener el promedio de la longitud de los brazos *p* y *q*, la relación de brazos, el índice centromérico, la longitud relativa del cromosoma y de los brazos, cuyas fórmulas son:

Longitud promedio del brazo

$$q = (q1+q2)/2 \quad p = (p1+p2)/2$$

Índice centromérico (*i*)

$$i = (\text{Longitud del brazo corto del cromosoma } (p) / \text{Longitud total del cromosoma } (q+p)) \times 100$$

Relación de brazos (*r*)

$$r = q/p$$

Longitud relativa del cromosoma (*Hrl*)

$$Hrl = (\text{Longitud del cromosoma total} / \text{Sumatoria de la longitud de los cromosomas del conjunto haploide}) \times 100$$

Longitud relativa del brazo

$$Hrl \ q \ o \ p = (\text{Longitud del brazo } (q \ o \ p) / \text{Sumatoria de la longitud de los cromosomas del conjunto haploide}) \times 100$$

Estas medidas fueron calculadas para cada individuo, y luego se obtuvo un promedio para cada población.

Posteriormente, con el uso del programa Adobe® Fotoshop® 9.0, se elaboraron los ideogramas, en base a los promedios obtenidos de las mediciones para cada par

cromosómico en todas las poblaciones, empleando las gráficas obtenidas en el programa Excel 2000.

La morfología cromosómica se estableció de acuerdo a lo modificado de Levan *et al.* (1964) por Aiassa *et al.* (2001) como metacéntrica (M) (r entre 1-1.5; i entre 50-40), submetacéntrica (SM) (r entre 1.51-7; i entre 39.9-12.5) y acrocéntrica o telocéntrica (A-T) ($r > 7.1$; i entre 12.4-0).

Algunos preparados fueron procesados para revelar el patrón de Bandas-C (Sumner, 1972):

- a) Una vez realizados, los preparados se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 horas.
- b) Se colocan los preparados en capsulas de petri, y se hidrolizan con HCl 0.2 N a temperatura ambiente durante 1 hora.
- c) Se lavan los preparados con agua destilada.
- d) Se tratan con la solución de Hidróxido de Bario 0.3 N previamente calentado a baño a 60 °C por un tiempo que varía entre 15 a 20 segundos.
- e) Se lava con agua destilada.
- f) Se colocan las láminas en solución 2X SSC a 60 °C durante 1 hora (Na₃ Citrato SH₂ O = 8.85g/1000ml; NaCl = 17.5 g/1000ml)
- g) Se lavan con agua destilada y se realiza la tinción con Giemsa 3 % en buffer fosfato durante 10', se lavan con agua destilada y se secan en estufa.

Los preparados una vez listos también se observaron al microscopio, relevando las imágenes mediante el uso de cámara digital y posteriormente reutilizadas mediante Adobe® Fotoshop® 9.0.

2.5.4. Bioacústica: El registro de las señales acústicas se digitalizó y analizó mediante el uso del Programa Adobe® Audition™ 1.0 (FFT (*fast Fourier transform*): 1024 puntos; tasa de muestreo: 44.1 KHz; precisión: 16 bit). Cada serie de cantos fue caracterizado por las siguientes variables de acuerdo a Duellman & Pyles (1983) y Heyer *et al.* (1990) (Figuras 22 y 23):

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

1. Número de notas por canto (NN/C)
2. Duración del canto [ms] (DC): tiempo de la unidad acústica de vocalización de los anuros que puede o no estar dividido por notas iguales o diferentes.
3. Intervalo entre cantos [ms] (IC): periodo de tiempo que separa un canto de otro.
4. Duración de cada nota [ms] (DN): tiempo de la unidad del canto
5. Intervalo entre notas [ms] (IN): periodo de tiempo que separa una nota de otra.
6. Tasa de canto (TC): número de la unidad acústica por unidad de tiempo (cantos/minuto)
7. Frecuencia dominante del canto [Hz] (FDC): frecuencia que concentra más energía.
8. Frecuencia dominante de cada nota [Hz] (FDN)

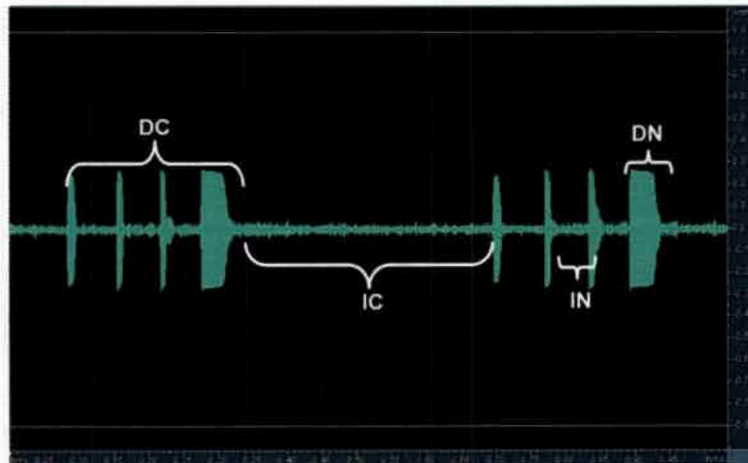


Figura 22. Oscilograma. Variables temporales.



Figura 23. Espectrograma. Variables espectrales.

En cuanto al tratamiento de datos, los mismos fueron procesados gráfica y analíticamente mediante los programas Microsoft Excel 2000 y Statgraphics Plus 5.0.

Para cada especie se realizó una descripción del lugar de canto y una descripción general del canto de advertencia.

Se calcularon medias, desviaciones estándar, máximo y mínimo de cada variable, para cada especie y luego separadas por cantos de acuerdo al número de notas.

Para *H. pulchellus*, se realizó una comparación entre poblaciones, empleando los siguientes análisis estadísticos:

- ANOVA con las variables compartidas por los individuos de las poblaciones en estudio.
- Si el resultado fue significativo se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para determinar que poblaciones son diferentes.
- Se realizaron regresiones simples entre cada una de las variables acústicas y la temperatura del aire, con la finalidad de probar la dependencia de las variables respecto de este parámetro ambiental. Las variables que mostraron dependencia con la temperatura fueron ajustadas a la temperatura media correspondiente para cada población.
- Con los valores ajustados de cada variable se realizó un Análisis Discriminante, para estudiar la variación entre poblaciones.

Para *H. cordobae* que se cuenta con datos de diferentes poblaciones se presentan tablas con los valores medios y desviaciones estándar de cada variable para cada población en particular estudiada. También se obtuvieron los valores medios y desviaciones estándar de cada especie para el análisis comparativo. En ambos casos se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

- ANOVA con las variables compartidas por los individuos de las poblaciones o especies en estudio.
- Si el resultado fue significativo se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para determinar que poblaciones o especies son diferentes.
- Se realizaron regresiones simples entre cada una de las variables acústicas y la temperatura del aire, con la finalidad de probar la dependencia de las variables respecto de este parámetro ambiental. Las variables que mostraron dependencia con la

temperatura fueron ajustadas a la temperatura media correspondiente para cada población o especie.

- Con los valores ajustados de cada variable se realizó un Análisis Discriminante, para estudiar la variación entre poblaciones o entre especies.
- Se realizaron regresiones simples entre las variables acústicas y la latitud y altitud de cada localidad.
- En *H. cordobae*, a partir del análisis discriminante realizado se calcularon las diferencias acústicas entre las seis poblaciones con las distancias de Mahalanobis. Para evaluar la asociación entre las distancias geográficas (en kilómetros) y las distancias acústicas (distancias de Mahalanobis) se realizó el test de Mantel utilizando MANTEL para Windows 1.18 (Cavalcanti, 2005).
- Para el análisis entre especies, mediante el uso de la matriz de distancias cuadradas de Mahalanobis se realizó un análisis de agrupamiento (Cluster Análisis) utilizando el método de ligamento promedio no ponderado (UPGMA) con el objetivo de analizar el grado de relación entre las cuatro especies analizadas.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados generales

El análisis morfométrico se realizó en un total de 175 individuos de las cuatro especies en estudio; mientras que las mediciones de eritrocitos se efectuaron en 125 individuos de las cuatro especies. En la Tabla 2 se especifican el número de individuos por especie a los cuales se efectuaron las medidas morfológicas y a los que se efectuaron las medidas de sus eritrocitos señalando además la localidad y provincia correspondiente a su captura.

Tabla 2. Especie, número de individuos analizados mediante morfometría y eritrometría, localidad y provincia de los sitios de captura.

Especie	Individuos analizados		Localidad	Provincia
	Morfometría	Eritrometría		
<i>H. cordobae</i>	15	15	La Carolina	San Luís
<i>H. cordobae</i>	16	4	La Posta, Pampa de Achala	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	11	10	Achiras	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	28	23	Las Guindas, Alpa Corral	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	11	9	Los Tabaquillos	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	5	5	Los Linderos	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	27	7	Río Cuarto	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	17	16	Las Acequias	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	15	15	Alejandro Roca	Córdoba
<i>H. riojanus</i>	18	11	Sañogasta	La Rioja
<i>H. andinus</i>	12	10	Amaichá del Valle	Tucumán
Total	175	125		

De las mediciones realizadas se puede observar que las especies estudiadas son de tamaño pequeño (31-61 mm).

Los eritrocitos de estas especies son, como es característico de los anfibios, de forma ovalada y con el núcleo localizado en el centro.

En cuanto a citogenética, los resultados obtenidos de los individuos procesados se detallan en la Tabla 3.

Para las cuatro especies en estudio se determinó un nivel de ploidía de $2n = 2x = 24$, con un número fundamental $NF = 48$; y mediante el análisis de las diacinesis se determinó la formación de 12 bivalentes y en la Meiosis II se contabilizaron 12

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

cromosomas, pudiendo así corroborar (*H. cordobae* e *H. pulchellus*) o determinar (*H. riojanus* e *H. andinus*) el nivel de ploidía de las especies estudiadas.

Tabla 3. Especie, localidad, provincia y número de individuos analizados mediante citogenética.

Especie	Localidad	Provincia	Nº de Individuos analizados
<i>H. cordobae</i>	La Carolina	San Luis	8
	Pampa de Achala	Córdoba	11
	Achiras	Córdoba	3
	Las Guindas, Alpa Corral	Córdoba	5
	Los Tabaquillos	Córdoba	5
	Los Linderos	Córdoba	3
Total			35
<i>H. pulchellus</i>	Las Acequias	Córdoba	4
	Río Cuarto	Córdoba	21
	Alejandro Roca	Córdoba	4
Total			29
<i>H. riojanus</i>	Sañogasta	La Rioja	12
Total			12
<i>H. andinus</i>	Amaichá del Valle	Tucumán	8
Total			8

Los individuos de las especies analizadas se los ha observado emitir su canto fuera del agua, en la orilla o bien posados sobre piedras o vegetación próximas a los cuerpos de agua; o bien semi-sumergidos en el agua, sujetos a la vegetación acuática.

Por lo general estas especies emiten sus cantos formando coros, aunque también se han detectado individuos vocalizando solos. El canto se inicia comúnmente por un individuo, y luego en forma de respuesta a este se van sumando otros individuos. Emiten series de cantos por un período de tiempo, y luego van cesando su canto de manera progresiva, hasta quedar nuevamente uno o dos individuos cantando solos, hasta detenerse por completo; luego de un período entre 15 y 30 minutos aproximadamente, comienzan nuevamente a cantar. En estos períodos de silencio puede que otro grupo de individuos de la misma especie que estén alejados comiencen a cantar de la misma forma descripta anteriormente.

Se observó la forma de un canto básico para todas las poblaciones: canto no pulsado, compuesto por una serie de notas (dos a siete notas por canto), de las cuales, en su mayoría, las notas finales son de mayor duración que las restantes.

Una peculiar característica de las cuatro especies estudiadas es que emiten un sonido simple tonal, diferentes a las notas del canto característico (Figura 24). Este sonido es emitido una o varias veces cuando el individuo comienza a cantar, tal como lo cita Barrio (1962, 1965), sin embargo, hemos observado que esta nota también es emitida entre cantos o al final de los mismos.

Cuando los individuos comienzan sus emisiones acústicas en coros, es notorio destacar que los intervalos entre cantos son mayores cuando los individuos inician y finalizan sus vocalizaciones. Adicionalmente, se ha observado que los intervalos entre cantos son mayores cuando los individuos cantan solos que cuando vocalizan en coro. Los intervalos entre cantos tienen desvíos standard muy elevados, esto último podría deberse a que los individuos emiten una serie de cantos separados por intervalos cortos, y a su vez, estas series, se separan por intervalos de mayor duración.

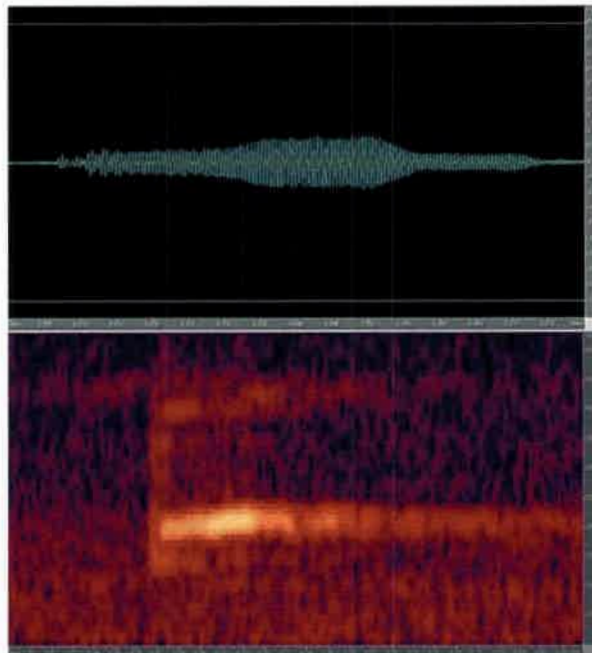


Figura 24. Espectrograma y sonograma de un sonido simple de *H. pulchellus*.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Se relevaron series de cantos en 129 individuos correspondientes a las cuatro especies estudiadas. Se analizaron un total de 2374 cantos (Tabla 4). Los cantos de advertencia fueron relevados en once localidades y se cuenta con series de cantos a diferentes temperaturas (Rangos: Aire 9,2-25; Agua 13-25; Sustrato 9,2-23).

Tabla 4. Especie, número de individuos examinados, número de cantos analizados, localidad y provincia de los ejemplares estudiados mediante bioacústica.

<i>Especie</i>	Nº de Ind analizados	Nº de cantos analizados	Localidad	Provincia
<i>H. cordobae</i>	15	328	La Carolina	San Luís
<i>H. cordobae</i>	11	194	La Posta, Pampa de Achala	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	9	114	Achiras	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	16	201	Las Guindas, Alpa Corral	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	7	169	Los Tabaquillos	Córdoba
<i>H. cordobae</i>	2	84	Los Línderos	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	19	402	Río Cuarto	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	10	435	Las Acequias	Córdoba
<i>H. pulchellus</i>	12	216	Alejandro Roca	Córdoba
<i>H. riojanus</i>	17	140	Sañogasta	La Rioja
<i>H. andinus</i>	11	91	Amaichá del Valle	Tucumán
Total	129	2374		

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los diferentes caracteres analizados, morfometría, eritrometría, citogenética y bioacústica, de manera independiente para las cuatro especies del género *Hypsiboas* estudiadas.

Hypsiboas cordobae (Barrio, 1965)

Morfometría

En cuanto a la coloración de la especie, se han observado individuos verde claro con su manchado característico en color amarillo (Figura 25); también se han observado individuos verde claro sin manchas, e individuos color marrón claro o canela con el manchado en color marrón más oscuro o incluso en algunos casos color cobre/dorado (Figura 26). Las manchas observadas en esta especie constan de un fino punteado con el aspecto de un retículo en medio del cual aparecen otras manchas de mayor dimensión, que en general no confluyen. En todos los individuos la coloración ventral es un color amarillo claro.



Figura 25. *H. cordobae*, vista dorsal. Ejemplar machos, Los Tabaquillos. Córdoba.



Figura 26. *H. cordobae*, vista dorsal. Ejemplar machos, Los Tabaquillos. Córdoba. Foto: P. Grenat.

Para cada una de las variables morfológicas relevadas se estimó la media, el desvío, máximo y mínimo. Fueron medidos un total de 86 individuos (72♂/14♀), pertenecientes a seis localidades. La tabla siguiente (Tabla 5) muestra los diferentes resultados obtenidos para las quince variables relevadas teniendo en cuenta ambos sexos. Mientras que la Tabla 6, muestra los resultados para cada localidad y sexo.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Tabla 5. Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) de *H. cordobae* (72♂/14♀).

Variables	Media ± Desvío (rango) ♂	Media ± Desvío (rango) ♀
SVL	50,02 ± 3,94 (41,30-61,23)	54,50 ± 5,74 (41,1-61,87)
HW	14,63 ± 1,30 (12,30 -18,47)	15,80 ± 1,42 (13,11 -18,61)
LC	15,72 ± 1,44 (11,42-19,84)	17,25 ± 1,66 (14,55-20,63)
HO	6,61 ± 0,74 (4,36-8,39)	7,23 ± 0,65 (6,41-8,58)
IN	4,08 ± 0,48 (3,00-5,28)	4,44 ± 0,51 (3,42-5,08)
IO	5,50 ± 0,61 (2,50-6,64)	5,74 ± 0,56 (5-6,58)
ON	3,97 ± 0,51 (2,67-5,09)	4,23 ± 0,57 (3,30-5,07)
RN	3,21 ± 0,48 (1,95-4,34)	3,27 ± 0,61 (2,42-4,29)
DO	5,13 ± 0,46 (4,08-6,62)	5,49 ± 0,40 (4,88-6,23)
LB	23,98 ± 2,35 (19,63-29,44)	25,60 ± 2,63 (20,47-29,37)
TF	10,12 ± 1,38 (7,35-13,20)	10,51 ± 1,95 (7,21-13,99)
LF	25,60 ± 2,52 (19,63-30,19)	27,98 ± 2,88 (23,14-32,81)
LT	25,41 ± 2,21 (20,36-30,46)	28,10 ± 3,45 (23,45-37,39)
LP	35,61 ± 3,28 (24,37-41,94)	38,24 ± 3,93 (32,22-43,50)
CT	14,14 ± 2,27 (10,16-19,06)	15,56 ± 2,59 (11,22-20,19)

Los machos adultos y sexualmente activos al momento de las capturas mostraron una longitud total promedio de 50,02mm. El largo promedio de la cabeza (15,72mm) corresponde al 34,43% de la longitud total, y es algo mayor a su ancho (14,63mm); mostrando un índice cefálico (ancho de la cabeza/largo de la cabeza) de 0,93.

Para el caso de las hembras, mostraron en promedio SVL mayor a los de los machos (54,50mm).

Tabla 6. Promedios de las 15 variable morfológica (mm) de *H. cordobae* (72♂/14♀) de las seis poblaciones en estudio.

<i>Localidad</i>	<i>n</i>	<i>SVL</i>	<i>HW</i>	<i>LC</i>	<i>HO</i>	<i>IN</i>	<i>IO</i>	<i>ON</i>	<i>RN</i>	<i>DO</i>	<i>LB</i>	<i>TF</i>	<i>LF</i>	<i>LT</i>	<i>LP</i>	<i>CT</i>
La Carolina	14 ♂	51,25	15,21	16,21	6,94	4,19	5,60	4,26	3,32	4,81	24,64	10,37	26,51	25,96	36,87	14,64
	1 ♀	53,61	16,55	16,1	7,43	4,78	5,29	3,65	3,33	5,11	25,96	11,06	28,87	27,68	33,12	14,1
Pampa de Achala	10 ♂	49,56	14,38	15,81	6,33	4,20	5,07	4,15	2,79	5,14	24,57	10,78	25,97	25,08	36,13	16,30
	6 ♀	57,21	16,18	17,91	6,99	4,53	5,80	4,69	2,80	5,59	26,98	11,81	29,67	28,59	40,84	17,91
Achiras	10 ♂	53,43	15,61	16,61	7,23	4,43	5,76	4,22	3,40	5,52	25,91	11,05	28,18	28,02	38,49	14,80
	1 ♀	55,08	15,86	16,61	7,65	4,17	5,8	4,41	3,39	5,45	25,06	11,72	24,11	37,39	37,07	15,9
Las Guindas	25 ♂	46,78	13,45	14,53	6,04	3,68	5,45	3,51	3,17	5,04	21,94	8,94	23,04	23,70	32,97	12,29
	3 ♀	46,14	13,62	15,19	6,72	3,81	5,51	3,41	3,22	5,25	21,41	7,94	24,52	24,39	33,61	13,36
Los Tabaquillos	8 ♂	50,56	15,55	16,35	6,89	4,28	5,47	4,03	3,43	5,03	23,68	9,88	26,36	25,47	36,20	13,61
	3 ♀	57,53	16,97	18,58	8,00	4,89	6,00	4,27	4,19	5,66	26,89	9,91	29,05	27,88	39,79	13,46
Los Linderos	5 ♂	56,99	15,91	17,36	7,42	4,55	5,80	4,47	3,29	5,86	27,84	12,49	28,75	27,81	37,55	17,12
	♀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para probar la distribución normal de los datos morfométricos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks. En la Tabla 7 se presentan los valores de p y del estadístico W para cada variable analizada. De las 15 variables estudiadas, en machos solo la distancia interocular y el largo del cuarto dígito posterior se alejan de la normalidad; mientras que en el caso de las hembras todas las variables resultaron normales.

Tabla 7. Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos y hembras de *H. cordobae*. W representa el estadístico Shapiro-Wilk (W) y p la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.

Variables	Machos		Hembras	
	W	p	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,985139	0,841278	0,924616	0,249865
Ancho de la cabeza (HW)	0,96847	0,199152	0,912166	0,167293
Largo cabeza (LC)	0,986946	0,900197	0,978781	0,938947
Distancia hocico-ojo (HO)	0,984795	0,828629	0,920297	0,217685
Distancia internarinas (IN)	0,981249	0,68004	0,941896	0,423727
Distancia interocular (IO)	0,912148	0,00002953*	0,923696	0,242668
Distancia ojo-narina (ON)	0,959488	0,0612779	0,940854	0,411043
Distancia rostro-narina (RN)	0,975217	0,415112	0,941802	0,422578
Diámetro del ojo (DO)	0,976852	0,482904	0,94253	0,431589
Largo del brazo (LB)	0,960163	0,0673485	0,912177	0,167352
Largo del 3 ^{er} dígito anterior (TF)	0,972285	0,307778	0,984315	0,978818
Largo del fémur (LF)	0,964337	0,118464	0,972122	0,863122
Largo de la tibia (LT)	0,982646	0,741692	0,89277	0,883248
Largo de la pata (LP)	0,971091	0,269942	0,928704	0,284208
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	0,956875	0,0421942*	0,973506	0,880948

Del ANOVA realizado para la comparación morfométrica entre machos y hembras resultó que 12 variables mostraron diferencias significativas entre machos y hembras, solo las variable distancia ojo-narina (ON), distancia rostro-narina (RN) y en el Largo del 3^{er} dígito anterior (TF) no mostraron diferencias significativas entre machos y hembras. En la Tabla 8 pueden observarse los p y el estadístico F para cada variable en particular, y en la Figura 27 se muestran los Box-plot de cada variable que muestra diferencias significativas. Para las variables que no presentan una distribución normal (distancia interocular y Largo del 4^{to} dígito posterior) el ANOVA de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre machos y hembras (IO: $p = 0,1881$; CT: $p = 0,0646$).

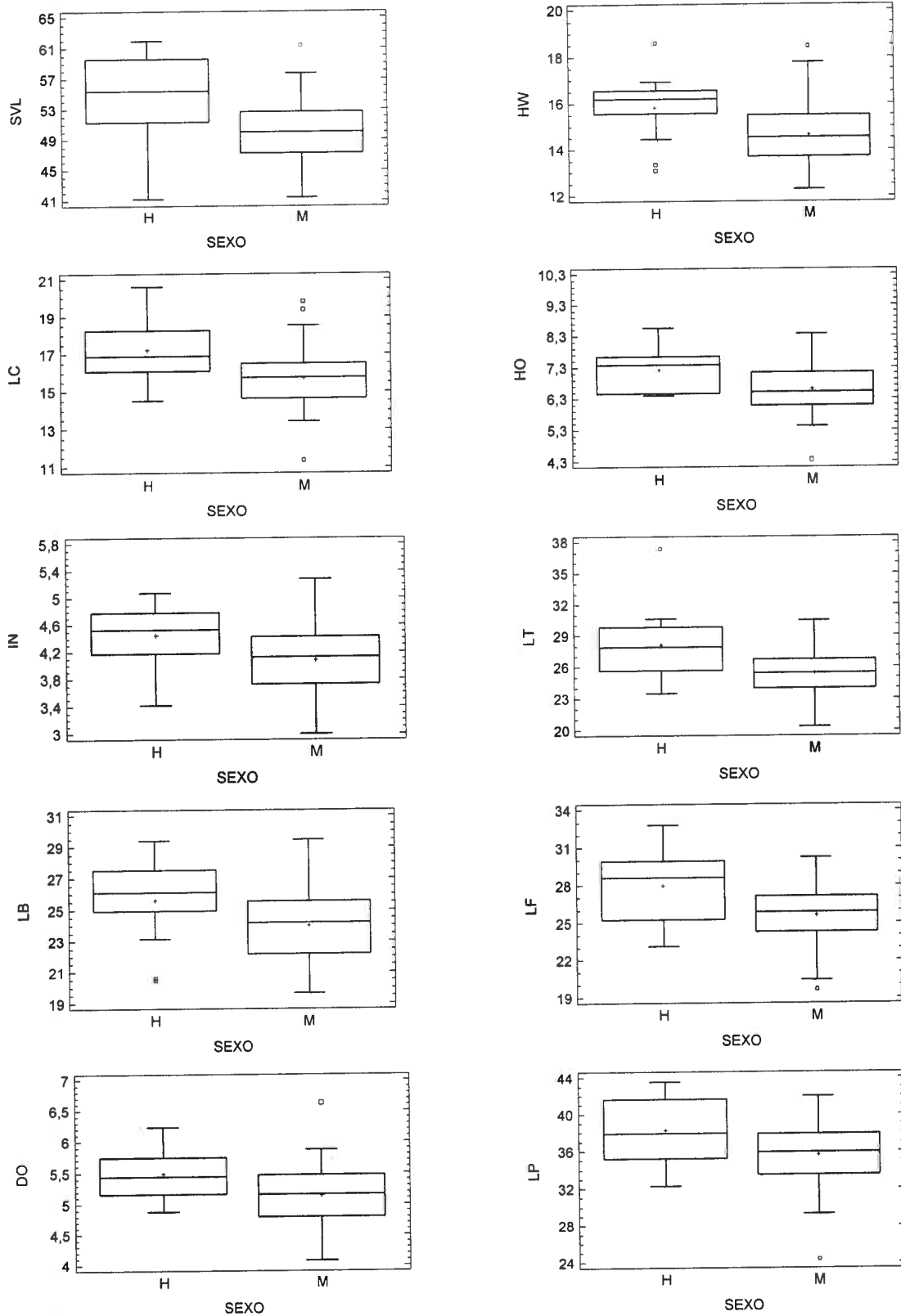


Figura 27. Variación morfométrica entre machos y hembras de *H. cordobae*. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.

Tabla 8. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar en morfometría individuos machos y hembras (72♂/14♀) de *H. cordobae*. El asterisco indica las variables en las que las diferencias morfológicas no resultaron significativas.

Variable	p	F
SVL	0,0005	12,91
HW	0,0031	9,27
LC	0,0007	12,52
HO	0,0046	8,46
IN	0,0125	6,52
ON	0,0882*	2,98
RN	0,7243*	0,13
DO	0,0079	7,42
LB	0,0239	5,29
TF	0,3633*	0,84
LF	0,0022	9,98
LT	0,0003	14,18
LP	0,0094	7,06

A partir de los datos obtenidos para cada localidad, que se presentan en la Tabla 6, se realizó un análisis comparativo entre las distintas poblaciones de *H. cordobae* estudiadas. Debido a las diferencias morfométricas entre sexos, solo se utilizaron los datos de los individuos machos.

Del análisis de ANOVA y ANOVA de Kruskal-Wallis para las variables que no presentan una distribución normal (distancia interocular y Largo del 4^{to} dígito posterior), todas mostraron diferencias significativas con $p < 0.05$.

A continuación se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las poblaciones entre sí. En todas las variables, excepto en el DO, RN y IO, se observó que la población de Las Guindas se diferencia significativamente de las demás poblaciones, mostrando en todas las variables valores menores para esta población (Figura 28); mientras que en el caso de las demás variables, las diferencias entre poblaciones fue variable.

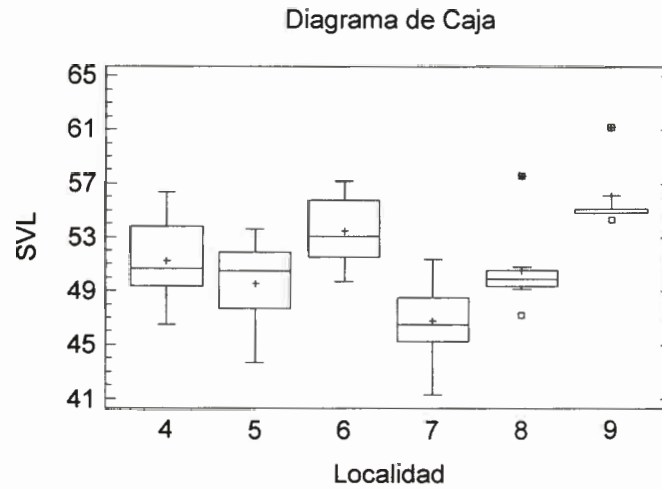


Figura 28. Variación del SVL entre poblaciones de *H. cordobae*. 4. La Carolina; 5. Pampa de Achala; 6. Achiras; 7. Las Guindas; 8. Los Tabaquillos; 9. Los Linderos.

Del análisis discriminante se obtuvieron tres funciones altamente significativa ($p = 0,0000$; $p = 0,0000$; $p = 0,0010$), la primera con un Eigenvalue de 4,31 explica el 57,09% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,90101; λ de Wilks = 0,0217874); la segunda función con un Eigenvalue de 1,62 explica el 21,48% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,78663; λ de Wilks = 0,115778); y la tercera función discriminante con un Eigenvalue de 1,13 explica el 15,01% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,72894; λ de Wilks = 0,303713) (Figura 29).

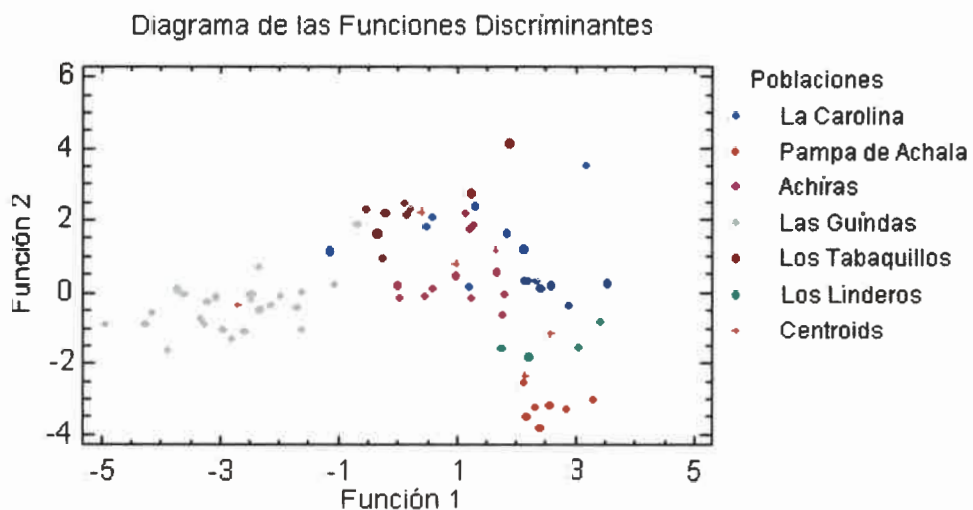


Figura 29. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables morfométricas de *H. cordobae* para las seis poblaciones estudiadas.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

El porcentaje de individuos correctamente clasificados fue de 87,50%. En la tabla de clasificación (Tabla 9) se observa que el porcentaje de individuos correctamente clasificados fue alto, siendo igual o mayor al 70% en todos los casos.

Tabla 9. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas de *H. cordobae* para las seis poblaciones estudiadas. 1. La Carolina; 2. Pampa de Achala; 3. Achiras; 4. Las Guindas; 5. Los Tabaquillos; 6. Los Linderos.

Grupo Actual	n	Localidades					
		1	2	3	4	5	6
1	14	11 (78,57%)	0	0	0	2 (14,29%)	1 (7,14%)
2	10	1 (10%)	7 (70%)	2 (20%)	0	0	0
3	10	1 (10%)	0	9 (90%)	0	0	0
4	25	0	0	0	24 (96%)	1 (4%)	0
5	8	1 (12,50%)	0	0	0	7 (87,50%)	0
6	5	0	0	0	0	0	5 (100%)

Para evaluar si las variables morfométricas presentan variación geográfica se realizaron regresiones simples entre cada variable morfométrica y las latitudes de cada población.

De las 15 variables morfométricas, ocho mostraron relación significativa con la latitud, y en todas el coeficiente de correlación fue positivo, entre ellas el SVL: SVL, $r=0,311852$, $R^2=9,72\%$, $p=0,0077$; HW, $r=0,257718$, $R^2=6,64\%$, $p=0,0288$; HO, $r=0,356189$, $R^2=12,68\%$, $p=0,0021$; IO, $r=0,3129$, $R^2=9,79\%$, $p=0,0074$; RN, $r=0,300864$, $R^2=9,05\%$, $p=0,0102$; LB, $r=0,23637$, $R^2=5,58\%$, $p=0,0456$; LF, $r=0,270305$, $R^2=7,30\%$, $p=0,0217$; LT, $r=0,377696$, $R^2=14,26\%$, $p=0,0011$ (Figura 30).

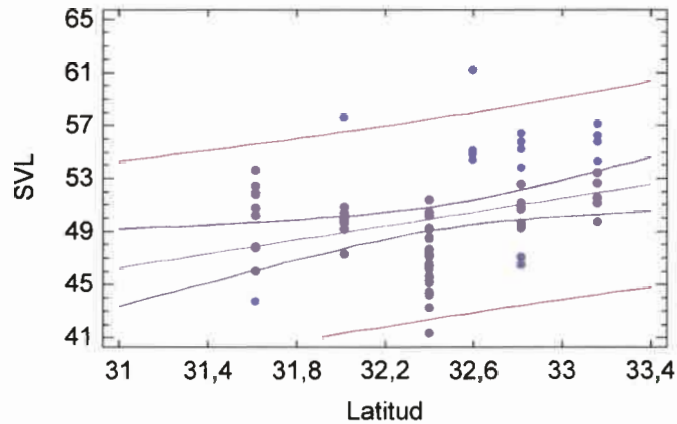


Figura 30. Regresiones lineales entre el SVL y la latitud de las seis poblaciones estudiadas.

El test de Mantel, utilizado para estimar la correlación entre las las distancias latitudinales y las distancias morfométricas (distancias de Mahalanobis), mostró que las diferencias morfométricas no presentaron correlación significativa con las distancias geográficas ($p=0,8866$; $r= -0,311$; $t= -1,2084$).

Luego se realizaron regresiones simples entre cada variable morfométrica y la altitud de cada población. De las 15 variables morfométricas, diez mostraron relación significativa con la altitud, y en todas el coeficiente de correlación fue positivo: SVL, $r=0,285117$, $R^2=8,13\%$, $p=0,0152$; HW, $r=0,344594$, $R^2=11,87\%$, $p=0,0030$; LC, $r=0,358225$, $R^2=12,83\%$, $p=0,0020$; IN, $r=0,354797$, $R^2=12,58\%$, $p=0,0022$; ON, $r=0,415709$, $R^2=17,28\%$, $p=0,0003$; LB, $r=0,345903$, $R^2=11,96\%$, $p=0,0029$; LF, $r=0,369992$, $R^2=13,68\%$, $p=0,0014$; LP, $r=0,255504$, $R^2=6,53\%$, $p=0,0303$; TF, $r=0,399827$, $R^2=15,98\%$, $p=0,0005$; CT, $r=0,48889$, $R^2=23,90\%$, $p=0,0000$ (Figura 31).

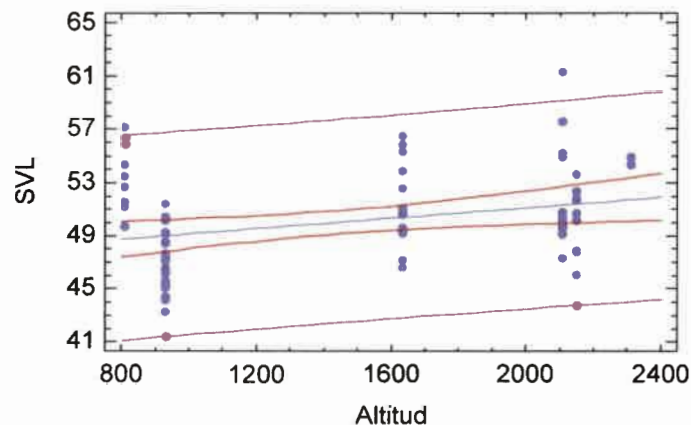


Figura 31. Regresiones lineales entre el SVL y la altitud de las seis poblaciones estudiadas.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

El test de Mantel, utilizado para estimar la correlación entre las distancias altitudinales (m.s.n.m.) y las distancias morfométricas (distancias de Mahalanobis), mostró que las diferencias morfométricas no presentaron correlación significativa con las distancias geográficas ($p=0,9649$; $r= -0,499$; $t= -1,8112$).

Eritrometría

Debido a que el análisis morfométrico realizado reveló que de 15 variables estudiadas solo tres no mostraban diferencias significativas entre machos y hembras, el análisis de eritrocitos se realizó teniendo en cuenta a individuos machos y hembras por separado.

En base a los datos obtenidos para machos y hembras respecto a las medidas de los eritrocitos (Tabla 10), se realizó un ANOVA, del cual resultó que para el largo, ancho, área de los eritrocitos y sus núcleos, y RE no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras, solo el RN presentó diferencias significativas entre machos y hembras (57♂/9♀) con un $p = 0,0281$ (Tabla 11).

Tabla 10. Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos, de acuerdo al sexo.

Sexo	N	Largo del Eritrocito (μm)	Ancho del Eritrocito (μm)	Área del Eritrocito (μm^2)	RE	Largo del núcleo (μm)	Ancho del núcleo (μm)	Área del núcleo (μm^2)	RN
Hembras Media \pm desvío (rango)	9	22,39 \pm 1,04 (20,62-24,42)	15,01 \pm 1,12 (13,76-16,43)	264,68 \pm 27,95 (237,08-313,08)	1,50 \pm 0,10 (1,39-1,64)	9,57 \pm 0,75 (8,42-10,94)	5,69 \pm 0,76 (5,10-7,56)	43,06 \pm 8,95 (35,37-64,91)	1,69 \pm 0,15 (1,45-1,93)
Machos Media \pm desvío (rango)	57	22,95 \pm 1,38 (19,95-25,77)	14,91 \pm 1,19 (13,09-17,59)	269,62 \pm 32,94 (213,34-353,85)	1,55 \pm 0,11 (1,33-1,77)	9,68 \pm 0,78 (7,93-11,44)	5,35 \pm 0,68 (4,18-7,80)	40,93 \pm 8,02 (27,67-68,41)	1,83 \pm 0,16 (1,43-2,16)

Tabla 11. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar en eritrometría individuos machos y hembras de *H. cordobae*. El asterisco indica las variables en las que las diferencias morfológicas resultaron significativas.

Variable	p	F
Largo del Eritrocito	0,2475	1,36
Ancho del Eritrocito	0,8026	0,06
Área del Eritrocito	0,6718	0,18
RE	0,2167	1,56
Largo del núcleo	0,6905	0,16
Ancho del núcleo	0,1683	1,94
Área del núcleo	0,4696	0,53
RN	0,0281*	5,05

Teniendo en cuenta que para el caso de los eritrocitos, en la mayoría de las variables analizadas, las diferencias entre sexo no fueron significativas, los datos de eritrometría se analizaron nuevamente sin tener en cuenta el sexo.

En la Tabla 12 se resumen los valores medios y desvíos estándar de las medidas de tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos de los individuos analizados, por población y un promedio general de la especie.

Tabla 12. Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos por población

Localidad	N	Largo del Eritrocito (µm)	Ancho del Eritrocito (µm)	Área del Eritrocito (µm ²)	RE	Largo del núcleo (µm)	Ancho del núcleo (µm)	Área del núcleo (µm ²)	RN
La Carolina	15	22,93 ± 1,01	14,62 ± 1,23	263,83 ± 30,05	1,58 ± 0,11	9,66 ± 0,60	5,09 ± 0,42	38,63 ± 4,20	1,91 ± 0,17
Pampa de Achala	6	22,41 ± 0,52	15,04 ± 1,31	265,39 ± 27,32	1,50 ± 0,11	9,12 ± 0,84	5,44 ± 0,26	39,02 ± 4,11	1,68 ± 0,17
Achiras	10	23,42 ± 1,60	15,18 ± 1,55	280,72 ± 45,40	1,55 ± 0,10	9,99 ± 0,85	6,00 ± 1,12	47,72 ± 12,99	1,69 ± 0,18
Las Guindas	21	23,66 ± 1,14	15,06 ± 1,05	280,58 ± 28,22	1,58 ± 0,10	9,92 ± 0,83	5,55 ± 0,64	43,57 ± 7,91	1,80 ± 0,14
Los Tabaquillos	9	21,62 ± 0,67	15,35 ± 0,61	260,91 ± 15,99	1,41 ± 0,05	9,44 ± 0,54	5,19 ± 0,40	38,51 ± 4,41	1,83 ± 0,14
Los Linderos	5	21,14 ± 0,80	13,85 ± 0,94	230,56 ± 20,44	1,53 ± 0,10	9,01 ± 0,30	4,77 ± 0,07	33,69 ± 1,37	1,89 ± 0,06
<i>H. cordobae</i> Media ± desvío (rango)	66	22,54 ± 0,99 21,14-23,62	14,94 ± 0,62 13,85-15,59	265,40 ± 19,00 230,56-280,72	1,51 ± 0,07 1,41-1,57	9,54 ± 0,41 9,01-9,99	5,33 ± 0,42 4,77-6,00	40,86 ± 5,60 33,69-47,72	1,79 ± 0,10 1,66-1,90

En base a los datos obtenidos para cada población respecto al Área de los Eritrocitos y Área de los Núcleos se realizó un ANOVA, del cual resultó que ambas variables mostraron diferencias significativas entre las seis poblaciones estudiadas ($p = 0,0216$, $F = 2,88$; $p = 0,0056$, $F = 3,70$) (Figura 32).

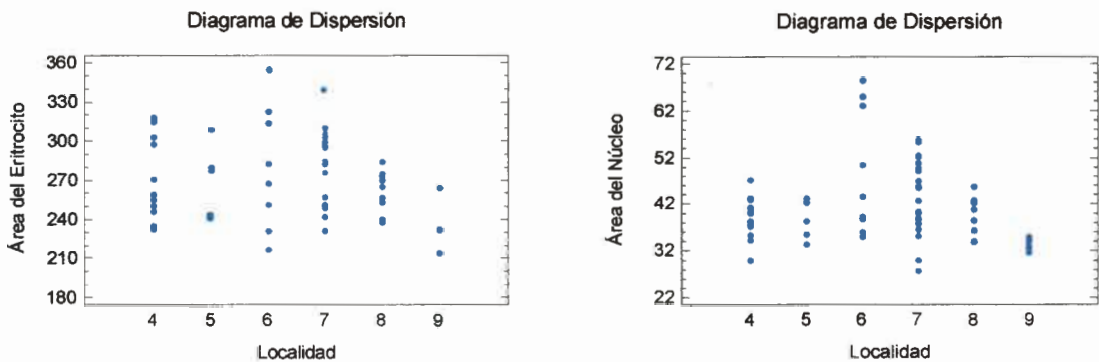


Figura 32. Variación del el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) en las seis poblaciones de *H. cordobae* estudiadas. 4. La Carolina; 5. Pampa de Achala; 6. Achiras; 7. Las Guindas; 8. Los Tabaquillos; 9. Los Linderos.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Al realizar un análisis discriminante entre las seis poblaciones para estas dos variables, se obtuvo una función discriminante significativa ($p = 0,0181$), con un Eigenvalue de 0,36 que explica el 88,71% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,51780; λ de Wilks = 0,699276). Sin embargo, en la tabla de clasificación, el porcentaje de casos correctamente clasificados fue de solo el 26, 15%.

Para analizar la variación del tamaño de los eritrocitos respecto a la latitud de cada población, se realizaron regresiones simples Área de los Eritrocitos y la latitud, y entre el Área de los Núcleos y la latitud. Para los dos casos se mostró que no hay relación estadísticamente significativa entre Área de los Eritrocitos y Núcleos y la latitud de las poblaciones estudiadas ($p=0,6290$; $p=0,1177$)

Luego se realizaron regresiones simples entre el Área de los Eritrocitos y la altitud de cada población, y entre el Área de los Núcleos y la altitud de cada población. En las dos regresiones se mostró una relación estadísticamente significativa negativa: Área del Eritrocito, $r=-0,382589$, $R^2=14,63\%$, $p=0,0017$; Área de los Núcleos, $r=-0,44269$, $R^2=19,59\%$, $p=0,0002$ (Figura 33).

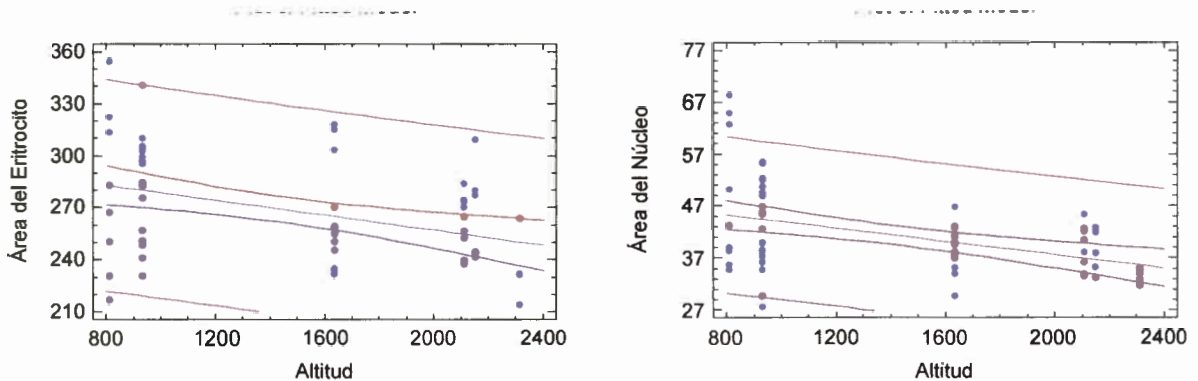


Figura 33. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el nivel altitudinal de las seis poblaciones en estudiadas en *H. cordobae*.

El análisis de correlación entre el tamaño de los eritrocitos (Área) y el largo hocico-cloaca (SVL), mostró una relación estadísticamente significativa entre el área de los eritrocitos y el SVL, con un p menor a 0,05 ($p = 0,0175$, $r = -0,293789$, $F = 5,95$). Sin embargo, no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el área del núcleo y el SVL ($p=0,3214$, $r = -0,124928$, $F = 1$) (Figura 34).

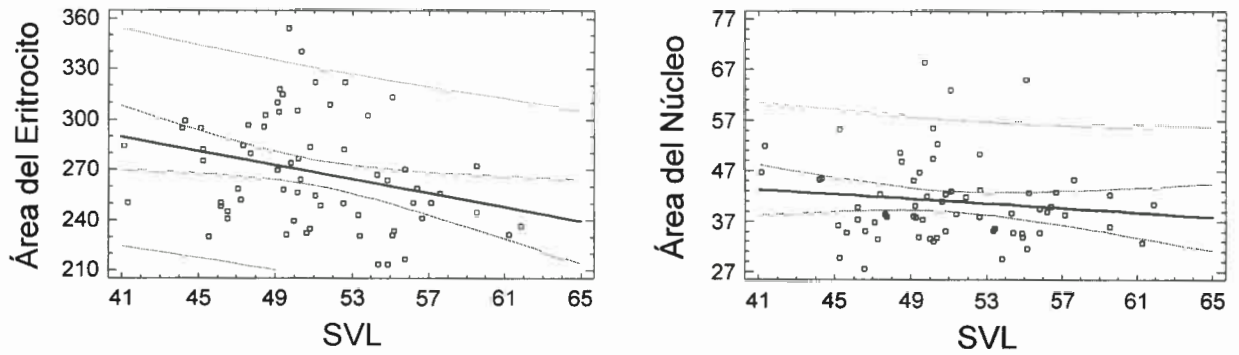


Figura 34. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en *H. cordobae*.

Citogenética

Se observaron cromosomas mitóticos (metafases) y cromosomas meióticos (diacinesis y Meiosis II), los cuales se especifican en la siguiente Tabla 13.

Tabla 13. Número de células en metafase, en diacinesis y en Meiosis II de individuos de *H. cordobae* para cada localidad.

Especie	Localidad	Provincia	N	Cromosomas Mitóticos (metafases)	Cromosomas Meióticos	
					Diacinesis	Meiosis II
<i>H. cordobae</i>	La Carolina	San Luís	4	13	26	11
	Pampa de Achala	Córdoba	9	14	40	9
	Achiras	Córdoba	2	1	6	7
	Las Guindas	Córdoba	2	6	10	2
	Los Tabaquillos	Córdoba	2	41	11	6
	Los Linderos	Córdoba	1	1	14	1
Total			20	76	107	36

N: número de individuos de los cuales se analizaron preparados citogenéticos y de los que se obtuvieron fotografías de células en metafase, diacinesis y Mitosis II.

A partir de las fotografías obtenidas se confeccionaron los cariotipos de cinco poblaciones de *H. cordobae*: La Carolina, Las Guindas, Los Linderos, Los Tabaquillos y Pampa de Achala (Figura 35).



Figura 35. Cariotipos de las poblaciones de *H. cordobae* estudiadas. a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala. Bar = 10µm.

El nivel de ploidía determinado para esta especie fue de $2n = 2x = 24$, con un número fundamental $NF = 48$.

Los ideogramas se establecieron teniendo en cuenta la longitud relativa de los cromosomas, la relación de brazos, el índice centromérico, la longitud relativa de los cromosomas y sus brazos (p y q) (Figura 36).

Se estableció la fórmula cariológica en 5:7. El cariotipo está compuesto por dos grupos de cromosomas según su tamaño: un grupo, pares del uno al cinco, comprende los cromosomas de mayor tamaño, con un largo relativo del cromosoma entre 19.37% (Los Tabaquillos) y 8.79% (La Carolina). Un segundo grupo, de siete cromosomas pequeños, con un largo relativo entre 8.52% (Pampa de Achala) y 3.81% (Las Guindas).

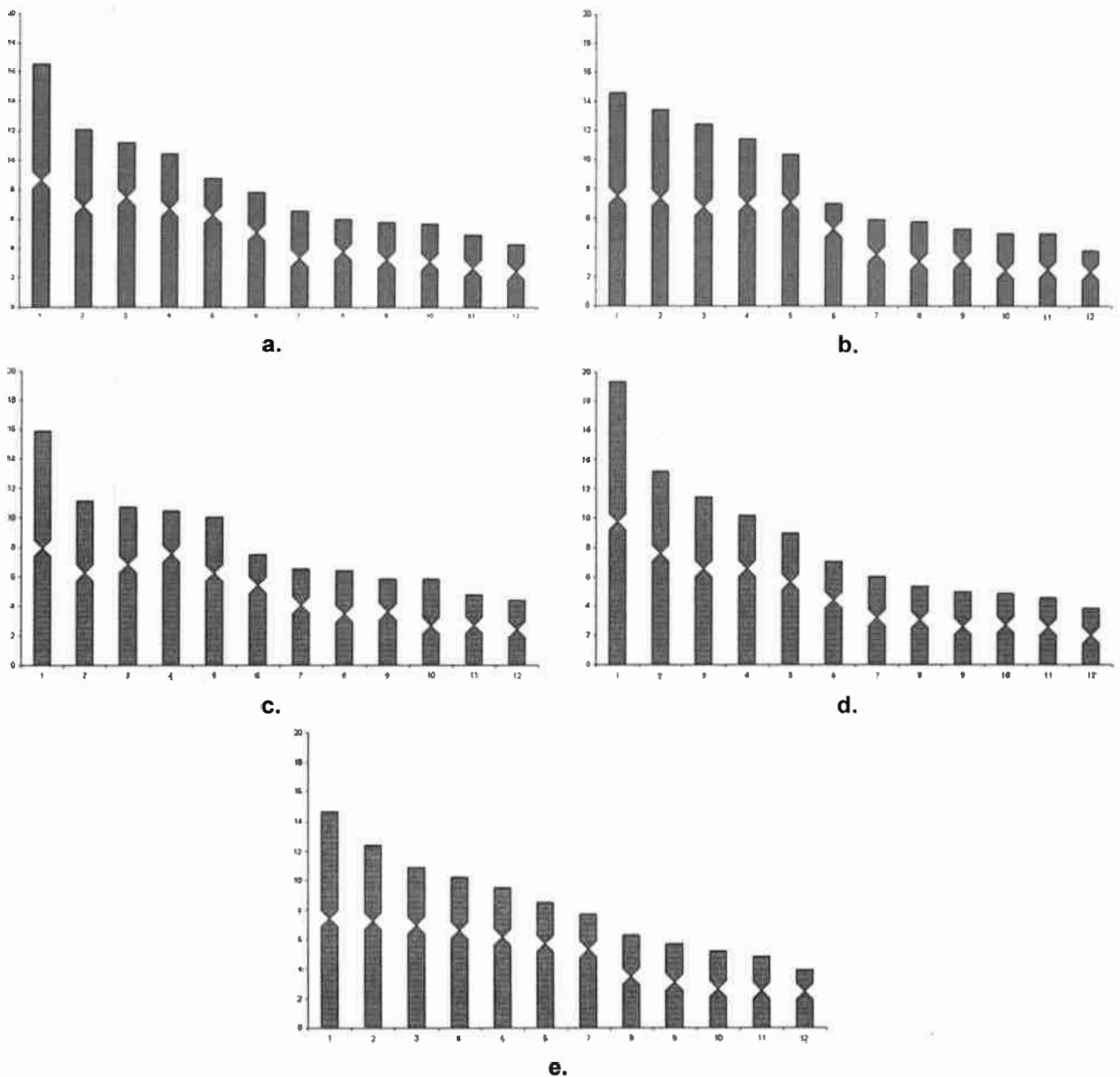


Figura 36. Ideogramas basados en los datos morfométricos de los cariotipos para: a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala.

En la Tabla 14 se observan las medidas morfométricas de los cromosomas de cada localidad.

Al evaluar los valores de relación de brazos e índices centroméricos, los pares del 1-6 y los pares del 10-12 presentan la misma morfología en las cinco localidades, siendo los pares 1 y 10-12 metacéntricos, y los pares 2-6 submetacéntricos.

Por el contrario, en los pares 7-9 la morfología no fue igual en las cinco poblaciones. El par 7 presentó morfología submetacéntrica en todas las localidades, excepto en La Carolina que es metacéntrico. El par 9 muestra una morfología metacéntrica en todas las localidades,

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

excepto en Los Linderos, que es submetacéntrico. El par 8 su morfología es metacéntrica en las localidades de Las Guindas, Los Linderos y Pampa de Achala, mientras que en La Carolina y Los Tabaquillos la morfología es submetacéntrica (Tabla 14).

Tabla 14. Parámetros del complemento cromosómico utilizados para la elaboración del ideograma de *H. cordobae* fórmula cariológica (5:7); NF=48.

P	La Carolina				Las Guindas				Los Linderos				Los Tabaquillos				Pampa de Achala			
	Hrl	r	i	T	Hrl	r	i	T	Hrl	r	i	T	Hrl	r	i	T	Hrl	r	i	T
1	16,54	1,28	43,87	M	14,57	1,13	47,07	M	15,90	1,18	45,92	M	19,37	1,14	46,80	M	14,65	1,19	46,02	M
2	12,07	1,67	37,66	SM	13,42	1,56	39,07	SM	11,12	1,57	38,97	SM	13,20	1,90	35,00	SM	12,42	1,82	37,99	SM
3	11,18	2,97	27,19	SM	12,43	1,57	39,00	SM	10,73	2,17	31,58	SM	11,45	1,78	36,18	SM	10,89	2,23	32,34	SM
4	10,43	2,68	29,35	SM	11,44	2,13	31,94	SM	10,44	3,40	22,79	SM	10,20	3,11	24,65	SM	10,24	2,32	30,31	SM
5	8,79	2,93	25,64	SM	10,37	3,08	25,35	SM	10,05	2,25	30,77	SM	9,01	2,46	29,10	SM	9,50	2,22	31,81	SM
6	7,82	2,18	31,56	SM	7,02	3,91	20,38	SM	7,51	3,43	22,63	SM	7,07	2,32	30,64	SM	8,52	2,88	26,79	SM
7	6,56	1,48	40,56	M	5,95	1,82	35,70	SM	6,54	2,02	33,40	SM	6,06	1,70	37,41	■	7,75	2,70	28,32	SM
8	6,01	1,80	36,41	■	5,80	1,45	40,91	M	6,44	1,47	40,43	M	5,38	1,55	39,53	SM	6,31	1,37	42,44	M
9	5,78	1,31	43,32	M	5,26	1,46	40,74	M	5,85	1,56	39,00	■	4,98	1,43	41,33	M	5,73	1,31	43,68	M
10	5,65	1,32	43,17	M	4,96	1,19	45,70	M	5,85	1,17	46,12	M	4,87	1,67	38,04	M	5,24	1,24	44,67	M
11	4,90	1,32	43,46	M	4,96	1,41	41,49	M	4,78	1,46	40,62	M	4,57	1,35	42,68	M	4,84	1,18	46,05	M
12	4,27	1,22	46,06	M	3,81	1,37	42,23	M	4,39	1,17	46,07	M	3,85	1,16	46,52	M	3,92	1,30	43,99	M

P: par; Hrl: longitud relativa del cromosoma; r: relación de brazos; i: índice centromérico; T: Tipo, M: metacéntrico, SM: submetacéntrico. En amarillo se resaltan los pares cromosómicos que se diferencian en morfología en las cinco poblaciones.

El análisis meiótico reveló 12 bivalentes en diacinesis (Figura 37) y 12 cromosomas en Meiosis II (Figura 38). Esto permitió corroborar el nivel de ploidía de la especie. En algunos casos, los bivalentes forman anillos, mostrando dos quiasmas terminales. Sin embargo, frecuentemente el par de cromosomas 1 grande, presenta solo un quiasma terminal. En estos casos el bivalente muestra una configuración abierta particular, no en forma de anillo, sino en forma de cadena (Figura 37). Esta configuración meiótica se observó en las seis poblaciones estudiadas, sin embargo, en la población de Pampa de Achala, adicionalmente se observaron células que presentan los 12 bivalentes formando anillos. En la Tabla 15 se muestra el número de células observadas para cada población, diferenciando aquellas en las cuales se observó la formación de cadenas en el par cromosómico 1 en diacinesis.

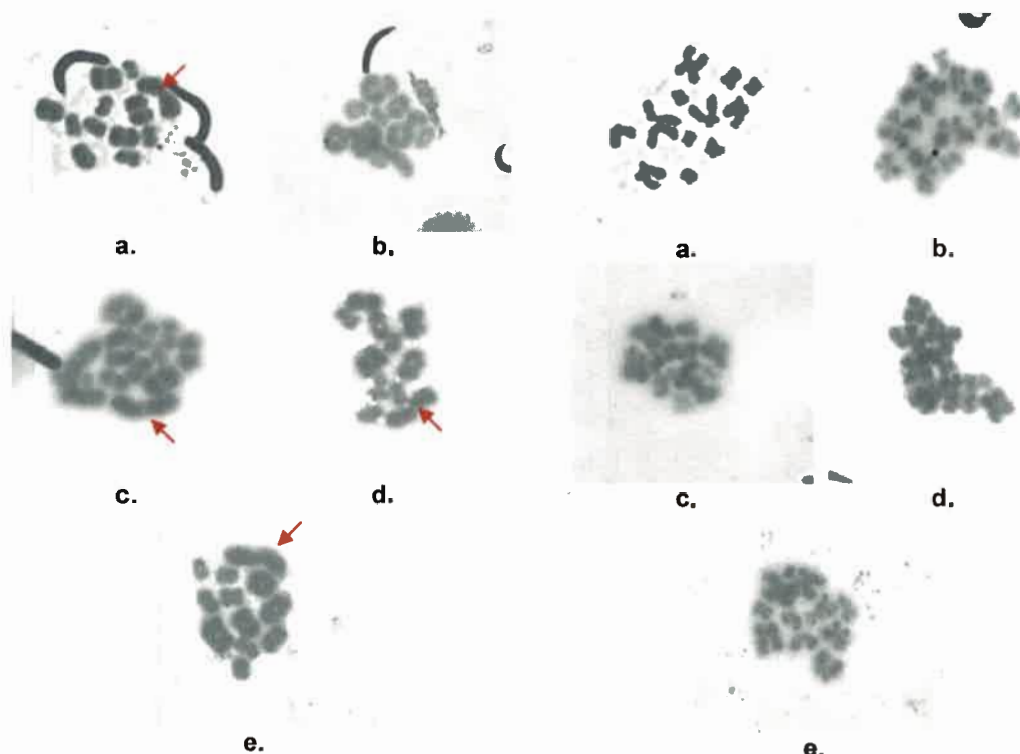


Figura 37. Diacinesis con 12 bivalentes: a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala. Las flechas indican el par de cromosomas 1 con una configuración abierta, en forma de cadena.

Figura 38. Meiosis II con 12 cromosomas: a. La Carolina; b. Las Guindas; c. Los Linderos; d. Los Tabaquillos; e. Pampa de Achala.

Tabla 15. Células en diacinesis en las que se observaron las diferentes figuras meióticas.

Total de Células contadas	N° individuos	Figuras meióticas (12 bivalentes)		Localidad
		Anillos	11 Anillos y 1 Cadena	
26	4		26	La Carolina
10	2		10	Las Guindas
14	1		14	Los Linderos
11	2		11	Los Tabaquillos
40	8	23	17	Pampa de Achala
6	2		6	Achiras
107	19	23	84	Total

El Bando-C, obtenido para la población de Pampa de Achala, mostró heterocromatina constitutiva en la región centromérica de todos los pares cromosómicos. Además se reveló heterocromatina pericentromérica en los pares 4, 5 y 8-12. El Bando-C fue observado también en la región intersticial del brazo corto del par 1 y en la región telomérica del brazo largo de los pares 4-6 y 9 (Figura 39).

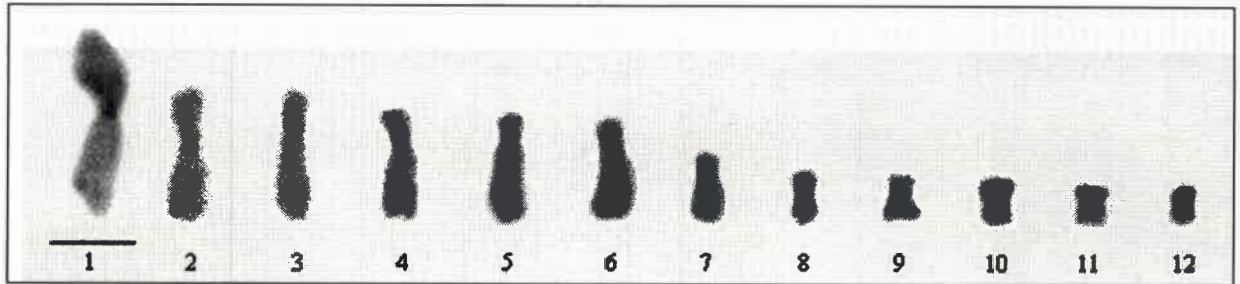


Figura 39. Cariotipo de *H. cordobae* (Pampa de Achala) con Bando-C.

Bioacústica

En la especie *H. cordobae* los ejemplares que fueron observados vocalizando, lo hacían desde la orilla de los cuerpos de agua (ríos o arroyos), sobre vegetación acuática en contacto con el agua, o sobre piedras, sin contacto directo con el agua, e incluso sobre vegetación sobreelevada como cortaderas, en donde los individuos se ubican a una distancia de un metro del suelo/agua. También fue posible observar individuos cantando parcialmente sumergidos en el agua, sujetos a vegetación acuática sumergida.

Se analizaron un total de 60 individuos y 1090 cantos de la especie *H. cordobae*. Los promedios generales de la especie para cada variable acústica analizada se muestran en la Tabla 16. Se observa una duración de canto promedio de 295,95ms; y las notas se observa un leve aumento de las primeras a las últimas, siendo la nota final de mayor duración que las que la preceden. Los intervalos entre notas varían entre 48,8ms y 67,6ms por lo general con valores mayores a los de las notas del canto. En cuanto a frecuencias, la frecuencia promedio del canto es de 1908,53 Hz., correspondiéndose, por lo general con la frecuencia de la última nota. Además, en la frecuencia de cada nota, también se observa un leve aumento de las primeras a las últimas notas (Tabla 16).

Tabla 16. Medias, desvíos y rangos de las variables acústicas analizadas para *H. cordobae*.

Variables	Media
DC	295,95 ± 51,16
DN1	24,95 ± 8,63
IN1	67,06 ± 15,95
DN2	23,4 ± 7,84
IN2	58,60 ± 13,48
DN3	30,08 ± 10,66
IN3	53,49 ± 13,16
DN4	47,43 ± 10,57
IN4	48,83 ± 10,28
DN5	47,07 ± 7,75
IC	1773,5 ± 1069,5
FDC	1908,53 ± 271,47
FD1	1787,26 ± 224,63
FD2	1819,41 ± 237,24
FD3	1885,95 ± 252,39
FD4	1929,47 ± 276,34
FD5	1836,97 ± 262,42

En cuanto a los intervalos entre cantos, para esta especie el valor promedio fue de 1773,5ms, con un rango entre 276,92-5092ms. Esto pone en evidencia lo mencionado anteriormente respecto al elevado margen de los desvíos standard que esta variable presenta. Esto se refleja también en la Tasa de Cantos, para esta especie, la TC promedio fue de 30,8 c/m, con un mínimo de 10 c/m y un máximo de 81 c/m.

Los resultados manifiestan la existencia de cuatro tipos de cantos de advertencia, con dos, tres, cuatro y cinco notas. Los cantos alternan regularmente, y pueden diferenciarse:

1. individuos solo con cantos de cuatro notas
2. individuos con cantos de cuatro notas alternados con cantos de cinco notas
3. individuos con cantos de cuatro notas alternados con cantos de tres notas
4. individuos con cantos de tres, cuatro y cinco notas alternados regularmente (Figura 40)
5. un solo individuo presentó únicamente cantos de tres notas.



Figura 40. Canto de advertencia de *H. cordobae* con cantos de tres, cuatro y cinco notas.

Del total de la muestra, 1090 cantos analizados, se registró un 1,74% (19 cantos) con dos notas; un 22,57% (246) de cantos de tres notas; un 65,23% (711) de cantos de cuatro notas y un 10,46% (114) de cantos de cinco notas.

De 60 individuos analizados, 21 presentan cantos de solo cuatro notas. Un solo individuo presentó cantos de tres notas. 19 individuos presentan cantos alternados de tres y cuatro notas; mientras que seis individuos mostraron cantos alternados de cuatro y cinco notas. Finalmente, 13 individuos presentan cantos alternados de tres, cuatro y cinco notas. Hasta el presente no se ha encontrado individuos que presentaran solo cantos de cinco notas. Ocho individuos presentan cantos de 2 notas, de los cuales cinco de ellos alternaban estos cantos de dos notas, con cantos de tres, cuatro y cinco notas; y en los tres restantes, los cantos de dos notas se alternan con cantos de tres y cuatro notas.

Los tres tipos de canto de *H. cordobae* difieren en su duración y en la particularidad de que las notas finales son de mayor duración que las que la preceden. Si se analizan comparativamente las diferentes notas de los tres tipos de canto, las dos primeras notas, en un canto de tres, presentan una duración promedio semejante a la duración de las tres primeras notas de un canto de cuatro, y a las cuatro primeras notas de un canto de cinco; coincidiendo además, en que las notas finales son las de mayor duración (Tabla 17). Sin embargo, en algunos individuos se observó que las notas finales tenían una duración semejante a las demás notas, e incluso en algunos individuos, la última nota era de menor duración que las restantes.

Tabla 17. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. cordobae* en cada tipo de canto. N = 60.

Variables	Cantos de 2 Notas	Cantos de 3 Notas	Cantos de 4 Notas	Cantos de 5 Notas
DC	116,68 ± 16,02	206,03 ± 34,15	309,94 ± 46,09	354,43 ± 47,74
DN1	17,32 ± 4,97	24,43 ± 11,99	26,91 ± 10,10	20,50 ± 7,48
IN1	54,58 ± 12,24	52,89 ± 17,85	66,91 ± 17,76	61,15 ± 12,17
DN2	42,42 ± 10,83	26,09 ± 11,56	25,12 ± 9,89	20,67 ± 5,44
IN2		48,72 ± 14,85	57,03 ± 16,17	53,88 ± 11,22
DN3		50,26 ± 10,82	27,83 ± 10,63	23,39 ± 6,92
IN3			51,03 ± 15,65	48,90 ± 9,58
DN4			51,81 ± 10,92	27,34 ± 9,50
IN4				48,87 ± 10,37
DN5				46,00 ± 9,12
FDC	1911,92 ± 271,45	1812,68 ± 258,30	1865,10 ± 259,13	1691,00 ± 308,87
FD1	1830,76 ± 253,96	1728,36 ± 256,55	1769,18 ± 219,21	1563,60 ± 264,85
FD2	1944,88 ± 274,90	1784,03 ± 242,55	1800,57 ± 230,43	1590,03 ± 278,42
FD3		1855,4 ± 242,66	1844,12 ± 244,97	1648,65 ± 295,47
FD4			1888,42 ± 253,51	1693,64 ± 300,79
FD5				1726,38 ± 291,22

En cuanto a los sonidos simples que emiten estas especies, para el caso de *H. cordobae* se analizaron un total de 63 emisiones simples correspondientes a 20 individuos relevados. Estas emisiones tienen una duración promedio de $124,52 \pm 26,52$ ms, con un rango entre 182 y 543ms de duración, y la FD osciló entre los 802,31 y los 2196 Hz. En estos sonidos se observa que la duración es mayor a las de las notas del canto del mismo individuo, y para el caso de las FD, las frecuencias de estas emisiones simples son siempre menores a los de los cantos emitidos por un mismo individuo.

A continuación se presentan los datos de las variables acústicas de *H. cordobae* para cada población en particular (Tabla 18).

Tabla 18. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. cordobae* para las seis poblaciones estudiadas.

Variables	La Carolina	Pampa de Achala	Achiras	Las Guindas	Los Tabaquillos	Los Linderos
DC	303,15 ± 36,50	269,03 ± 28,41	255,92 ± 51,65	327,39 ± 53,61	293,23 ± 42,77	328,06 ± 105,56
DN1	28,10 ± 10,43	23,43 ± 3,02	17,02 ± 5,52	26,21 ± 7,13	28,30 ± 12,25	23,64 ± 5,07
IN1	64,94 ± 17,23	58,89 ± 6,08	61,58 ± 6,91	81,19 ± 14,04	56,76 ± 8,84	75,66 ± 38,92
DN2	26,41 ± 11,53	19,44 ± 2,64	18,86 ± 6,33	23,88 ± 4,99	27,79 ± 7,85	23,74 ± 0,15
IN2	58,43 ± 17,53	53,42 ± 4,93	52,95 ± 5,22	67,52 ± 10,49	51,57 ± 10,15	67,18 ± 36,73
DN3	32,64 ± 15,37	23,84 ± 5,78	23,83 ± 9,38	33,00 ± 7,69	36,58 ± 4,81	27,35 ± 2,07
IN3	53,67 ± 18,91	50,93 ± 6,26	50,24 ± 5,13	58,74 ± 10,53	46,42 ± 12,39	63,78 ± 32,18
DN4	51,38 ± 10,05	43,28 ± 9,40	35,09 ± 5,57	51,67 ± 7,12	52,45 ± 10,68	46,74 ± 18,75
IN4	53,63 ± 12,23	52,75 ± 5,89	50,57 ± 4,87	38,59 ± 8,73	48,84 ± 15,18	41,38
DN5	49,28 ± 7,08	47,82 ± 5,78	37,29 ± 4,01	53,44 ± 9,07	49,36 ± 6,08	41,73
IC	1741,81 ± 1699,57	1713,15 ± 403,29	1701,94 ± 1101,43	2652,01 ± 252,82	1637,25 ± 740,25	
FDC	1811,50 ± 152,49	1709,84 ± 176,80	2009,08 ± 141,17	2223,99 ± 131,60	1647,17 ± 155,64	1669,04 ± 469,24
FD1	1752,20 ± 123,90	1649,82 ± 135,89	1780,01 ± 123,85	2040,92 ± 177,15	1562,53 ± 130,53	1595,92 ± 446,06
FD2	1774,21 ± 134,12	1672,57 ± 149,87	1885,12 ± 131,42	2047,24 ± 233,29	1598,32 ± 143,93	1621,60 ± 455,89
FD3	1802,01 ± 146,51	1706,45 ± 180,80	1977,74 ± 121,34	2173,46 ± 134,39	1640,47 ± 146,43	1648,88 ± 469,81
FD4	1835,51 ± 164,12	1731,45 ± 167,52	2033,44 ± 141,96	2227,39 ± 206,93	1685,81 ± 159	1677,93 ± 478,27
FD5	2090,33 ± 174,94	1666,96 ± 91,94	2004,71 ± 133,65	1865,61 ± 451,77	1741,09 ± 175,79	1375,60
TASA	35,13 ± 19,12	27,73 ± 5,97	37,56 ± 21,97	23,81 ± 10,60	32 ± 8,50	30 ± 21,21



En base a estos datos se realizaron análisis estadísticos para la comparación entre poblaciones. Para estos análisis se utilizaron siete variables temporales (DC, DN1, DN2, DN3, IN1, IN2, TC) y cuatro variables espectrales (FDC, FD1, FD2, FD3), ya que son aquellas variables que comparten todos los individuos analizados de las seis poblaciones en estudio.

De las once variables comparadas mediante ANOVA ($n = 60$) todas mostraron diferencias significativas, con $p < 0,05$ (Tabla 19), excepto la DN2 y la TC.

Tabla 19. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de *H. cordobae* para las seis poblaciones estudiadas. El asterisco indica las variables en las que las diferencias no fueron significativas.

Variable	p	F
DC	0,0053	3,77
DN1	0,0333	2,64
DN2	0,1037*	1,93
DN3	0,0243	2,83
IN1	0,0000	12,28
IN2	0,0003	5,63
FDC	0,0000	21,65
FD1	0,0000	13,39
FD2	0,0000	8,18
FD3	0,0000	16,60
TC	0,2253*	1,44

A continuación se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las poblaciones entre sí. En todas las variables espectrales (FDC, FD1, FD2, FD3) se observó que la población de Las Guindas se diferencia significativamente de las demás poblaciones, mostrando en todas valores mayores para esta población (Figura 41); mientras que en el caso de las demás variables, las diferencias entre poblaciones fue variable.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

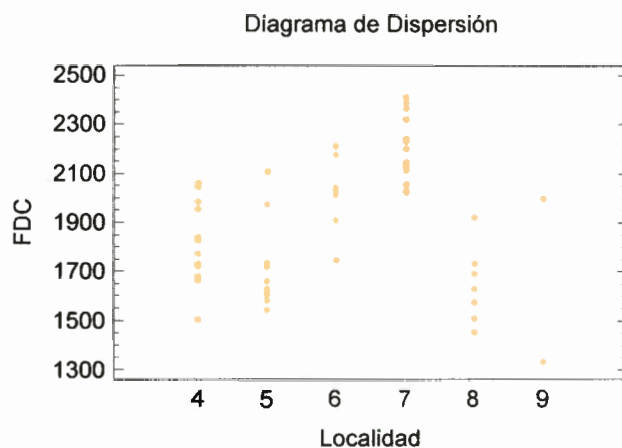


Figura 41. Variación de la FDC entre poblaciones de *H. cordobae*. 4. La Carolina; 5. Pampa de Achala; 6. Achiras; 7. Las Guindas; 8. Los Tabaquillos; 9. Los Linderos.

Las regresiones simples, mostraron que la DC, DN1, DN2, DN3, FDC, FD1, FD2 y FD3 varían en función de la temperatura, y fueron ajustadas a 14 °C (DC: $r = -0,300174$, $R^2 = 9,01\%$, $p = 0,0198$; DN1: $r = -0,453634$, $R^2 = 20,57\%$, $p = 0,0003$; DN2: $r = -0,48574$, $R^2 = 23,59\%$, $p = 0,0001$; DN3: $r = -0,493132$, $R^2 = 24,31\%$, $p = 0,0001$; FDC: $r = -0,30833$, $R^2 = 9,50\%$, $p = 0,0165$; FD1: $r = -0,354682$, $R^2 = 12,57\%$, $p = 0,0054$; FD2: $r = -0,293676$, $R^2 = 8,62\%$, $p = 0,0228$; FD3: $r = -0,32585$, $R^2 = 10,61\%$, $p = 0,0111$). La IN1, IN2 y TC no varían en función de la temperatura (IN1: $r = -0,203309$, $R^2 = 4,13\%$, $p = 0,1192$; IN2: $r = -0,134806$, $R^2 = 1,81\%$, $p = 0,3045$; TC: $r = 0,116846$, $R^2 = 1,36\%$, $p = 0,3740$).

Del análisis discriminante entre las seis poblaciones se obtuvo una función altamente significativa ($p = 0,0003$), con un Eigenvalue de 2,22 explica el 71,19% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,83058; λ de Wilks = 0,142319).

A continuación se presenta la tabla de clasificación (Tabla 20) en la cual se muestra que el porcentaje de individuos correctamente clasificados fue de 65%. En la misma puede observarse que sólo para la localidad de Las Guindas, el porcentaje de clasificación errónea es menor al 20 %; incluso en las localidades de La Carolina y Los Linderos el porcentaje de clasificación errónea es mayor al 50 %. En la Figura 42 esta cuestión también se ve reflejada, ya que no se observan las poblaciones bien discriminadas.

Tabla 20. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas de *H. cordobae* para las seis poblaciones estudiadas. 1. La Carolina; 2. Pampa de Achala; 3. Achiras; 4. Las Guindas; 5. Los Tabaquillos; 6. Los Linderos.

Grupo Actual	n	Localidades					
		1	2	3	4	5	6
1	15	5 (33,33%)	1 (6,67%)	2	0	3 (20%)	4 (26,67%)
2	11	1 (9,09%)	7 (63,64%)	1 (9,09%)	0	1 (9,09%)	1 (9,09%)
3	9	0	1 (11,11%)	7 (77,78%)	1 (11,11%)	0	0
4	16	0	0	2 (12,50%)	14 (87,50%)	0	0
5	7	2 (28,57%)	0	0	0	5 (71,43%)	0
6	2	0	0	0	0	1 (50%)	1 (50%)

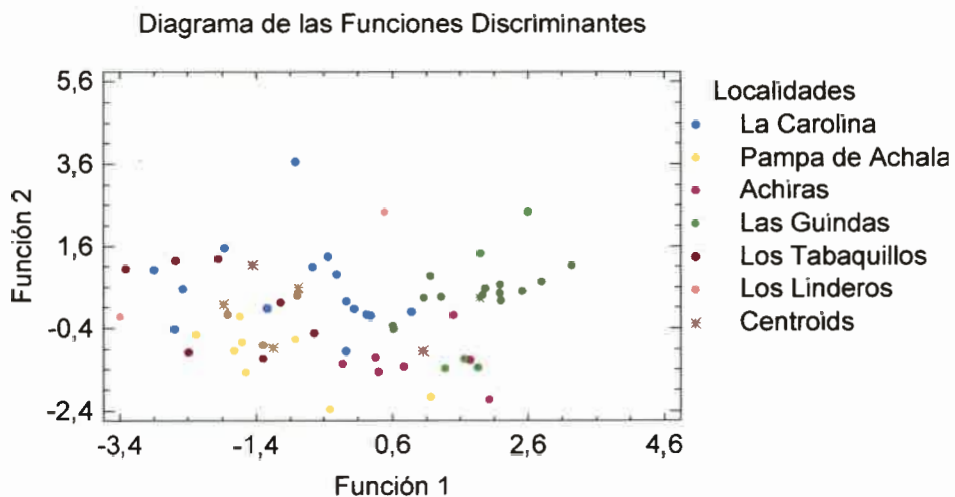


Figura 42. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado utilizando las variables acústicas de *H. cordobae* para las seis poblaciones estudiadas.

Para evaluar si las variables acústicas se correlacionan con la latitud se realizaron regresiones simples entre cada una de las variables medidas para *H. cordobae* y las latitudes de cada población. Seis de las variables mostraron relación significativa con la latitud, y en todas el coeficiente de correlación fue positivo. Estas seis variables corresponden a las seis variables espectrales medidas: FDC, $r=0,360441$, $R^2=12,99\%$, $p=0,0047$; FD1, $r=0,303589$, $R^2=9,21\%$, $p=0,0184$; FD2, $r=0,269183$, $R^2=7,24\%$,

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

$p=0,0375$; FD3, $r=0,30973$, $R^2=9,59\%$, $p=0,0160$; FD4, $r=0,253356$, $R^2=6,41\%$, $p=0,0529$ y FD5, $r=0,482949$, $R^2=23,32\%$, $p=0,0228$ (Figura 43).

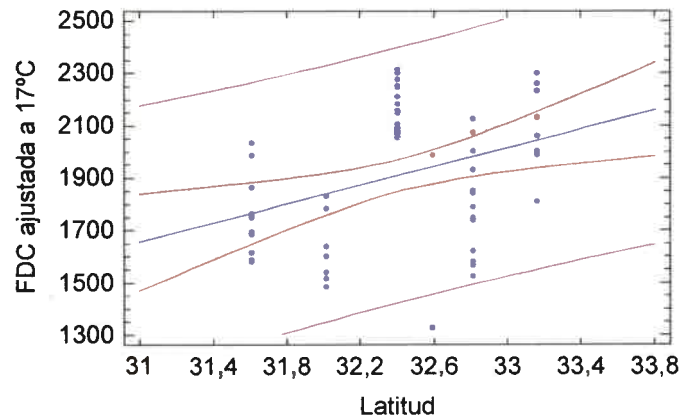


Figura 43. Regresiones lineales entre la FDC ajustada a 17°C y la latitud de las seis poblaciones estudiadas.

Del test de Mantel, las diferencias acústicas (distancias de Mahalanobis) no presentaron correlación significativa con las distancias geográficas ($p=0,0635$; $r= -0,498$; $t= -1,5262$).

Luego se realizaron regresiones simples entre cada variable acústica y la altitud de cada población. Al igual que en el caso de la latitud, seis de las variables espectrales mostraron relación significativa con la altitud, sin embargo, en este caso, la correlación fue negativa. Estas seis variables corresponden a las seis variables espectrales medidas: FDC, $r=-0,766675$, $R^2=58,77\%$, $p=0,0000$; FD1, $r=-0,651443$, $R^2=42,43\%$, $p=0,0000$; FD2, $r=-0,593084$, $R^2=35,17\%$, $p=0,0000$; FD3, $r=-0,716933$, $R^2=51,39\%$, $p=0,0000$; FD4, $r=-0,589584$, $R^2=34,76\%$, $p=0,0000$ y FD5, $r= -0,519256$, $R^2=26,96\%$, $p=0,0133$ (Figura 44).

El test de Mantel, utilizado para estimar la correlación entre las distancias altitudinales (m.s.n.m.) y las distancias acústicas (distancias de Mahalanobis), mostró que las diferencias acústicas (distancias de Mahalanobis) no presentaron correlación significativa con las distancias geográficas ($p=0,9929$; $r= -0,737$; $t= -2,4537$).

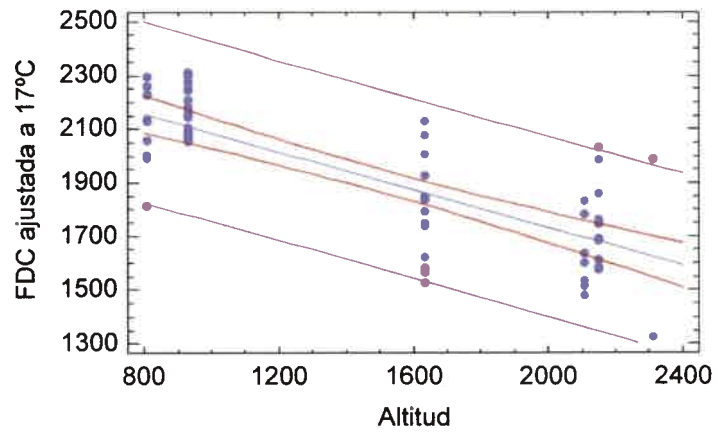


Figura 44. Regresiones lineales entre la FDC ajustada a 17°C y la altitud de las seis poblaciones estudiadas.

Hypsiboas pulchellus (Duméril & Bibron, 1841)

Morfometría

En *H. pulchellus* se observan coloraciones dorsales amarronadas o canela con el manchado en un color marrón más oscuro (Figura 45); también se observan individuos de un color claro grisáceo/beige sin manchas (Figura 46). En una sola oportunidad, en individuos de la localidad de Las Acequias, unos pocos ejemplares mostraron una coloración verde claro sin manchado, similar al verde de *H. cordobae*. Las manchas presentan forma de retículo, conectadas entre sí, como se observa en la Figura 45. En esta especie también se observó un color beige claro en la zona ventral.



Figura 45. *H. pulchellus*, vista dorsal. Ejemplar macho, Las Acequias, Córdoba.



Figura 46. *H. pulchellus*, vista lateral. Ejemplar macho, Las Acequias, Córdoba.

En la Tabla 21 se resumen la media, desvíos máximo y mínimo correspondientes a las 15 variables morfométricas relevadas en un total de 59 individuos (♂) de tres poblaciones estudiadas. En la Tabla 22 se muestran los promedios por localidad.

Tabla 21. Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) (59 ♂).

Variables	Media ± Desvío (rango) ♂
SVL	43,39 ± 3,70 (31,59-51,47)
HW	11,84 ± 1,14 (8,52-13,80)
LC	13,88 ± 0,91 (11,38-15,46)
HO	5,84 ± 0,61 (4,42-7,78)
IN	3,48 ± 0,39 (2,80-4,39)
IO	4,68 ± 0,67 (3,39-5,96)
ON	3,60 ± 0,44 (2,64-4,92)
RN	2,61 ± 0,46 (1,67-3,53)
DO	4,60 ± 0,43 (3,38-5,46)
LB	20,32 ± 1,72 (14,45-24,14)
TF	8,98 ± 1,05 (5,39-11,20)
LF	21,96 ± 1,99 (15,75-25,51)
LT	22,07 ± 1,92 (16,26-25,78)
LP	31,62 ± 3,04 (21,54-36,89)
CT	12,76 ± 1,65 (9,31-16,16)

Tabla 22. Promedios de las 15 variables morfológicas (mm) de *H. pulchellus* (59♂) de las tres poblaciones en estudio.

Localidad	n	SVL	HW	LC	HO	IN	IO	ON	RN	DO	LB	TF	LF	LT	LP	CT
Río Cuarto	27 ♂	43,27	12,03	13,69	5,75	3,53	4,80	3,60	2,54	4,65	20,39	9,02	21,99	22,47	31,68	13,16
Las Acequias	17 ♂	46,34	12,49	14,45	6,37	3,69	5,02	3,92	2,98	4,86	21,53	9,51	23,55	23,26	33,53	13,45
A. Roca	15 ♂	40,26	10,75	13,58	5,40	3,17	4,05	3,22	2,32	4,23	18,83	8,30	20,10	20,02	29,32	11,25

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

Los machos adultos y sexualmente activos al momento de las capturas mostraron una longitud total promedio de 43,39mm. El largo promedio de la cabeza (13,88mm) corresponde al 31,98% de la longitud total, y es algo mayor a su ancho (11,84mm); mostrando un índice cefálico (ancho de la cabeza/largo de la cabeza) de 0,85.

De la prueba de Shapiro-Wilks realizada para poner a prueba la normalidad de los datos de las 15 variables morfométricas, solo el largo de la pata mostró una distribución alejada de la normalidad. En la Tabla 23 se resumen los valores de *p* y del estadístico *W* para cada variable.

Tabla 23. Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos de *H. pulchellus*. *W* representa el estadístico Shapiro-Wilk y *p* la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.

Variable	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,978608	0,624590
Ancho de la cabeza (HW)	0,968412	0,266686
Largo cabeza (LC)	0,969925	0,308477
Distancia hocico-ojo (HO)	0,969929	0,308592
Distancia internarinas (IN)	0,955909	0,0680214
Distancia interocular (IO)	0,964628	0,1812700
Distancia ojo-narina (ON)	0,986712	0,9144148
Distancia rostro-narina (RN)	0,955354	0,0637026
Diámetro del ojo (DO)	0,969935	0,3087650
Largo del brazo (LB)	0,97492	0,477295
Largo del fémur (LF)	0,972138	0,377681
Largo del 3 ^{er} dígito anterior(TF)	0,974685	0,468406
Largo de la tibia (LT)	0,959715	0,105701
Largo de la pata (LP)	0,946352	0,0211615*
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	0,972674	0,395824

A partir de los datos obtenidos para cada localidad (Tabla 22) se realizó un análisis comparativo entre las tres poblaciones de *H. pulchellus*.

Del análisis de ANOVA y ANOVA de Kruskal-Wallis (Largo de la Pata: $p=0.00003$, $K=20,65$), todas mostraron diferencias significativas con $p < 0.05$ y un nivel de confianza del 95% (Tabla 24) (Río Cuarto $n = 27$, Las Acequias $n = 17$, Alejandro Roca $n = 15$).

Tabla 24. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar las variables morfométricas de *H. pulchellus* para las tres poblaciones en estudio.

Variable	p	F
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,0000	16,54
Ancho de la cabeza (HW)	0,0000	14,97
Largo cabeza (LC)	0,0064	5,54
Distancia hocico-ojo (HO)	0,0000	16,35
Distancia internarinas (IN)	0,0003	9,65
Distancia interocular (IO)	0,0000	12,83
Distancia ojo-narina (ON)	0,0000	14,50
Distancia rostro-narina (RN)	0,0001	11,78
Diámetro del ojo (DO)	0,0000	12,53
Largo del brazo (LB)	0,0000	14,33
Largo del fémur (LF)	0,0000	19,94
Largo del 3 ^{er} dígito anterior (TF)	0,0034	6,29
Largo de la tibia (LT)	0,0000	21,07
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	0,0001	11,87

Del test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las poblaciones entre sí, se obtuvieron los siguientes resultados: las variables SVL, HO, ON, LB, LF y LP muestran diferencias significativas entre las tres poblaciones. En los gráficos Blox-plot puede observarse que todas los valores para estas variables son mayores en los individuos de la localidad de Las Acequias, valores intermedios se observan en los individuos de la localidad de Río Cuarto, y para la localidad de Alejandro Roca estas variables presentan valores menores (Figura 47). Para HW, DO, IN, IO, TF, LT y CT los valores muestran que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de Las Acequias y Río Cuarto, pero si existen diferencias significativas entre estas dos localidades y Alejandro Roca. En los gráficos Blox-plot, al igual que en las variables anteriores, estas variables son menores en los individuos de la localidad de Alejandro Roca. El LC y RN muestran que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de Alejandro Roca y Río Cuarto, pero si existen diferencias significativas entre estas dos y Las Acequias; en este caso también los gráficos Blóx-plot muestran que los valores de la localidad de Alejandro Roca son menores.

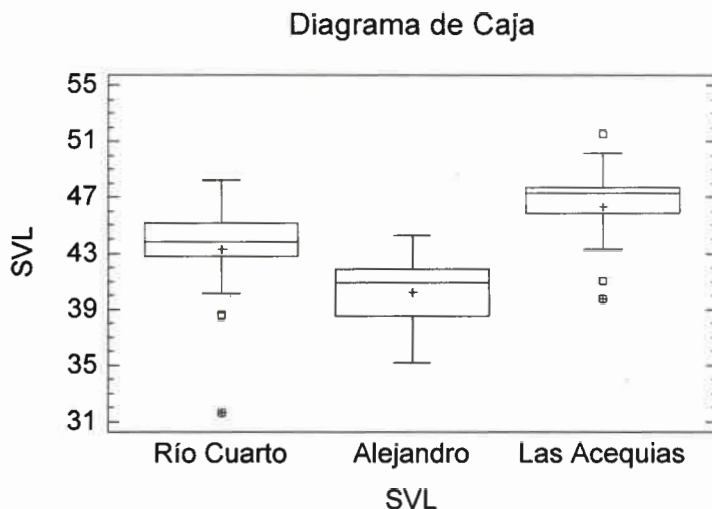


Figura 47. Variación del SVL entre individuos de las tres poblaciones estudiadas de *H. pulchellus*. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.

Los resultados del análisis discriminante entre poblaciones permitieron obtener dos funciones discriminantes significativas ($p = 0,0000$; $p = 0,0000$), la primera con un Eigenvalue de 2,07 explica el 57,15% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,82128; λ de Wilks = 0,127458), mientras que la segunda función discriminante explica el 42,85% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,78002; λ de Wilks = 0,391573).

El porcentaje de individuos correctamente clasificados fue de 91,53%. En la tabla de clasificación (Tabla 25) se observan que los porcentajes de individuos correctamente clasificados fueron altos, siendo mayores al 88% para las localidades de Las Acequias y Río Cuarto.

Tabla 25. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas de *H. pulchellus* para las tres poblaciones estudiadas.

Grupo Actual	n	Localidades		
		Río Cuarto	Alejandro Roca	Las Acequias
Río Cuarto	27	24 (88,89%)	1 (3,70%)	2 (7,41%)
Alejandro Roca	15	0	15 (100%)	0
Las Acequias	17	1 (5,88%)	1 (5,88%)	15 (88,24%)

Para la localidad de Alejandro Roca, en la cual los test a posteriori realizados anteriormente mostraron que todas las variables presentan valores menores a las otras dos localidades, el porcentaje de individuos correctamente clasificados fue del 100%. En el gráfico de la Figura 48 se observa a tres poblaciones bien discriminadas.

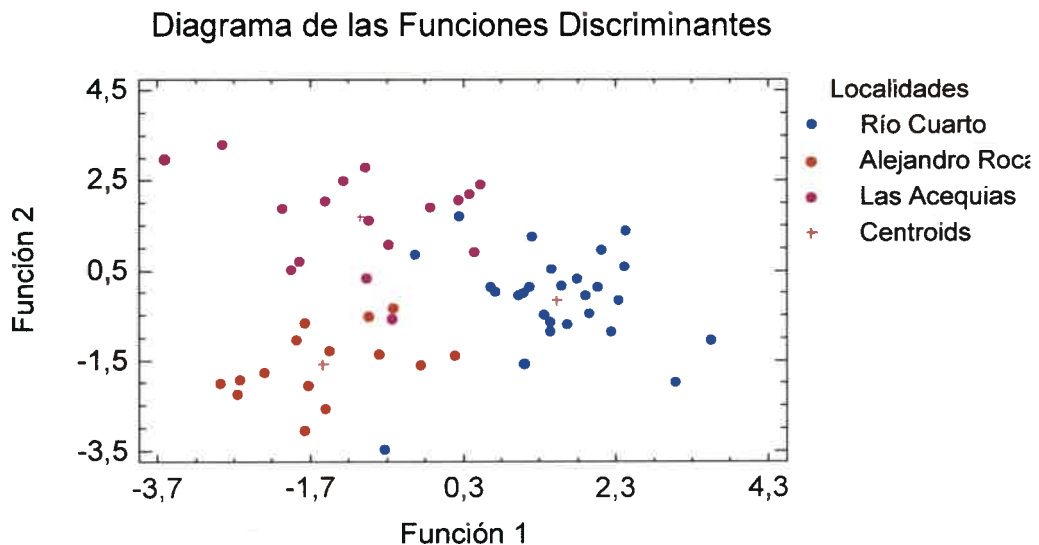


Figura 48. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables morfométricas de *H. pulchellus* para las tres poblaciones estudiadas.

En la Figura 49 se observa el gráfico de Scatterplot realizado con las dos variables de mayor peso, el SVL y el Largo del Fémur, el cual muestra que también que los individuos de menor tamaño (SVL) pertenecen a la localidad de Alejandro Roca. Los individuos de Río Cuarto muestran valores intermedios, y los individuos de Las Acequias son los que mayor SVL han presentado.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

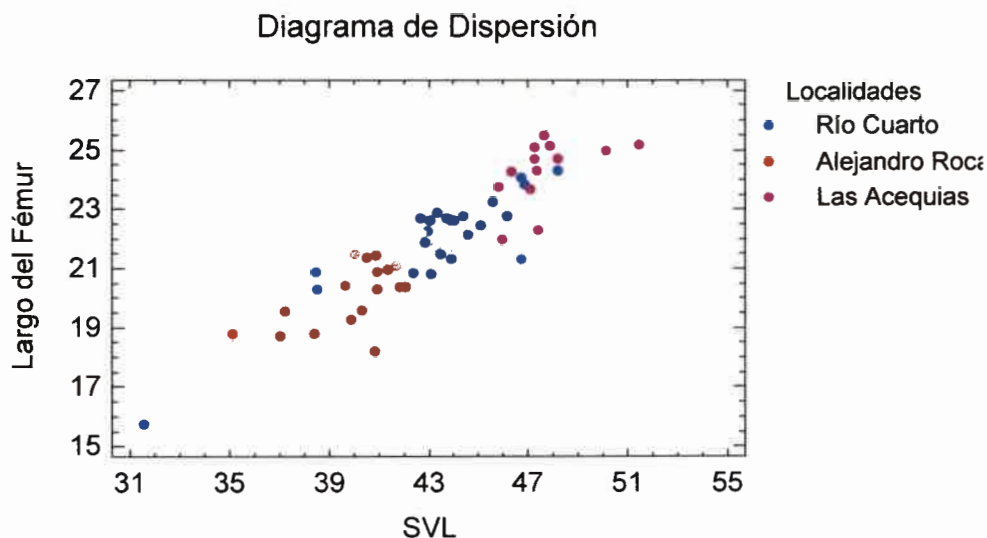


Figura 49. Distribución de los individuos de cada población considerando dos de las variables de mayor peso.

Eritrometría

En la Tabla 26 se resumen los valores medios y desvíos estándar de las medidas de tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos de los individuos analizados, por localidad y un promedio general de la especie.

En *H. pulchellus* la correlación entre el tamaño de los eritrocitos (Área) y el largo hocico-cloaca (SVL), como así también la correlación entre el tamaño del núcleo (Área) de los eritrocitos y el SVL, no resultó significativa (Área del eritrocito-SVL: $p = 0,7814$, $r = -0,0453$, $F = 0,08$; Área del núcleo-SVL: $p = 0,8105$, $r = -0,0391463$, $F = 0,06$) (Figura 50).

Tabla 26. Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos.

Localidad	N	Largo del Eritrocito (μm)	Ancho del Eritrocito (μm)	Área del Eritrocito (μm^2)	RE	Largo del núcleo (μm)	Ancho del núcleo (μm)	Área del núcleo (μm^2)	RN
Río Cuarto	9	21,50 \pm 0,81	13,34 \pm 0,70	225,56 \pm 15,81	1,61 \pm 0,09	9,54 \pm 0,56	4,80 \pm 0,42	36,06 \pm 4,29	2 \pm 0,16
Las Acequias	16	21,13 \pm 1,22	12,63 \pm 0,54	209,43 \pm 13,52	1,68 \pm 0,13	9,09 \pm 0,44	4,85 \pm 0,20	34,64 \pm 2,55	1,88 \pm 0,10
A. Roca	15	20,41 \pm 0,71	13,05 \pm 0,54	209,41 \pm 12,95	1,57 \pm 0,07	9,32 \pm 0,33	4,73 \pm 0,16	34,63 \pm 1,90	1,97 \pm 0,09
<i>H. pulchellus</i> Media \pm desvío (rango)	40	21,01 \pm 0,55 20,41-21,50	13,01 \pm 0,36 12,63-13,34	214,80 \pm 9,31 209,41-225,56	1,62 \pm 0,05 1,56-1,67	9,31 \pm 0,22 9,09-9,54	4,79 \pm 0,06 4,73-4,85	35,11 \pm 0,83 34,63-36,06	1,94 \pm 0,06 1,87-1,99

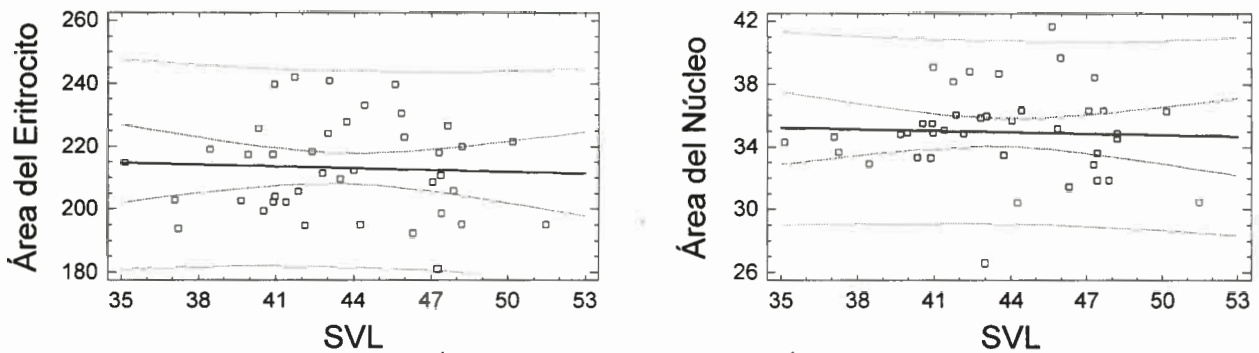


Figura 50. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en *H. pulchellus*.

En base a los datos obtenidos para cada población respecto al Área de los Eritrocitos y Área de los Núcleos se realizó un ANOVA (Río Cuarto $n = 9$, Las Acequias $n = 16$, Alejandro Roca $n = 15$), del cual resultó que sólo el Área de los Eritrocitos mostró diferencias significativas entre las tres poblaciones estudiadas ($p = 0,0148$, $F = 4,74$; $p = 0,4181$, $F = 0,89$).

Citogenética

En la Tabla 27 se observa el número de individuos de los que se obtuvieron fotografías, se observaron cromosomas en metafases y cromosomas en diacinesis y Meiosis II.

Tabla 27. Número de células en metafase, en diacinesis y en Meiosis II de individuos de *H. pulchellus* para cada localidad.

Especie	Localidad	Provincia	N	Cromosomas Mitóicos (metafases)	Cromosomas Meióticos	
					Diacinesis	Meiosis II
<i>H. pulchellus</i>	Río Cuarto	Córdoba	3	1	8	8
	Las Acequias	Córdoba	1	0	2	0
	Alejandro Roca	Córdoba	3	5	3	2
Total			7	6	13	10

N: número de individuos de los cuales se analizaron preparados citogenéticos y de los que se obtuvieron fotografías de células en metafase, diacinesis y Mitosis II.

**Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*,
Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina**

A partir de las fotografías obtenidas se confeccionó el cariotipo de la población de Río Cuarto (Figura 51). El nivel de ploidía determinado para esta especie fue de $2n = 2x = 24$, con un número fundamental $NF = 48$.

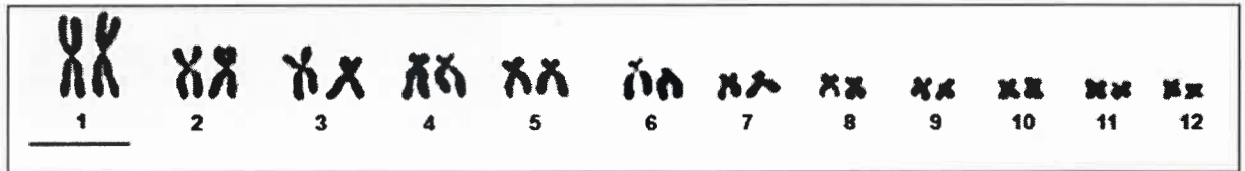


Figura 51. Cariotipo de *H. pulchellus* para la población de Río Cuarto. Bar = 10µm.

En la Tabla 28 se observan las medidas morfométricas de los cromosomas. Se estableció la fórmula cariológica en 1:5:6.

Tabla 28. Parámetros del complemento cromosómico utilizados para la elaboración del ideograma de *H. pulchellus* fórmula cariológica (1:5:6); $NF=48$.

P	<i>H. pulchellus</i> Río Cuarto			
	<i>rl</i>	<i>r</i>	<i>i</i>	T
1	12,26	1,09	47,88	M
2	10,63	1,52	39,72	SM
3	10,30	1,55	39,33	SM
4	10,30	2,89	25,89	SM
5	9,65	2,03	33,06	SM
6	8,79	2,78	24,45	SM
7	8,03	1,94	34,46	SM
8	7,70	1,43	41,25	M
9	6,51	1,26	44,41	M
10	6,18	1,27	44,15	M
11	5,75	1,06	48,45	M
12	3,90	1,10	47,62	M

P: par; *Hrl*: longitud relativa del cromosoma; *r*: relación de brazos; *i*: índice centromérico; T: Tipo, M: metacéntrico, SM: submetacéntrico.

El cariotipo está compuesto por tres grupos de cromosomas según su tamaño: el par cromosómico 1 es grande, con un largo relativo del cromosoma de 12.26%. Un segundo grupo, de cinco cromosomas medianos, con un largo relativo entre 10.63% y 8.79%. Y un tercer grupo de seis cromosomas pequeños, con un largo relativo entre 8.03% y 3.90%.

El ideograma fue realizado teniendo en cuenta la longitud relativa de los cromosomas, la relación de brazos, el índice centromérico, la longitud relativa de los cromosomas y sus brazos (p y q) (Figura 52).

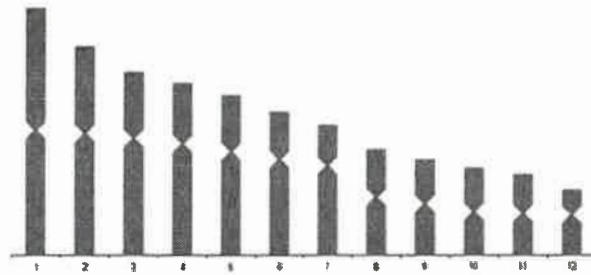


Figura 52. Ideograma basado en los datos morfométricos del cariotipo para la localidad de Río Cuarto.

El análisis meiótico reveló 12 bivalentes en diacinesis (Figura 53a) y 12 cromosomas en Meiosis II (Figura 53b). Esto permitió corroborar el nivel de ploidía de la especie.

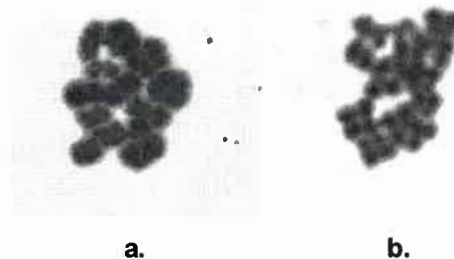


Figura 53. a. Diacinesis con 12 bivalentes, Río Cuarto; b. Meiosis II con 12 cromosomas, Alejandro Roca.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

En cuanto a las figuras meióticas, al igual que en *H. cordobae*, los bivalentes forman anillos presentando dos quiasmas terminales, y en algunos casos el par de cromosomas 1 grande, presenta solo un quiasma terminal, mostrando la configuración abierta en forma de cadena (Figura 53). Esta configuración meiótica se observó solo para la localidad de Río Cuarto (Tabla 29).

Tabla 29. Células en diacinesis en las que se observaron las diferentes figuras meióticas.

Total de Células contadas	N° individuos	Figuras meióticas (12 bivalentes)		Localidad
		Anillos	11 Anillos y 1 Cadena	
8	1	4	4	Río Cuarto
2	1	2		Las Acequias
3	2	3		Alejandro Roca
13	4	9	4	Total

El Bando-C mostró heterocromatina constitutiva en la región centromérica de todos los pares cromosómicos, y la heterocromatina pericentromérica también se reveló en todos los pares, excepto en el par 8. El Bando-C fue observado también en la región intersticial del brazo largo del par 2; mientras que en las regiones teloméricas el bando fue observado en el brazo corto de los pares 1, 3, 5, 7 y 8, y en el brazo largo de los pares 1-10 (Figura 54).

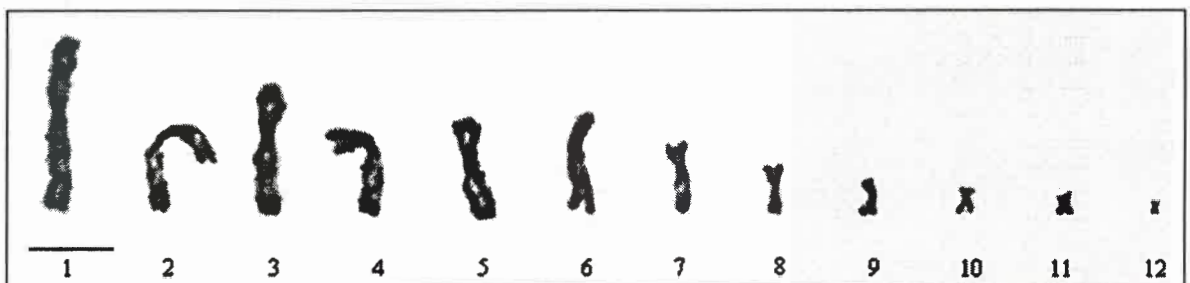


Figura 54. Cariotipo de *H. pulchellus* (Río Cuarto) con Bando-C.

Bioacústica

Los ejemplares de *H. pulchellus* se observaron vocalizando en la orilla de los cuerpos de agua, sobre vegetación cercana al agua o incluso vegetación sobreelevada tales como cortaderas, juncos y troncos de árboles, o bien sobre piedras. También se las observó cantando en el interior de las lagunas sobre juncos o cortaderas, a unos 20 centímetros de la base, o sobre vegetación acuática en contacto con el agua. En *H. pulchellus* no se observaron individuos cantando sumergidos en el agua.

Del análisis de los cantos de advertencia pudo observarse la forma de un canto básico formado por dos notas (Figura 55). En *H. pulchellus* también se encontraron individuos que presentaban cantos de una sola nota alternados con cantos de dos notas. Sin embargo, estos cantos formados solo por una nota ocurren en muy baja proporción (1,99%), es decir, de 1056 cantos analizados, 21 cantos son de una nota.



Figura 55. Canto de advertencia de *H. pulchellus* con dos notas.

En referencia a los cantos de dos notas, del mismo modo que en *H. cordobae*, las notas finales son de mayor duración que las que le preceden, la nota dos es de mayor duración que la nota uno.

La frecuencia dominante del canto oscila entre valores de 1503 y 2756 Hz, con una media de 2331,99 Hz, mientras que en las notas (uno y dos) se observó también que la frecuencia dominante de la segunda nota ($2345,24 \pm 207,013$ Hz) es mayor en frecuencia dominante que la primer nota ($2212,89 \pm 273,287$ Hz).

El intervalo entre cantos presentó un promedio y un desvío de $291,33 \pm 136,28$ ms; y un rango entre 154 y 504ms. Para la Tasa de cantos, esta especie presentó un amplio

rango, habiéndose encontrado individuos con una TC de 34 c/m o individuos con 211 c/m, con una media de 95,08 c/m.

Comparativamente, debido a que en *H. cordobae* los tres tipos de canto difieren significativamente en su duración, el canto de tres notas es el que más se asemeja al de *H. pulchellus*. Sin embargo, los valores promedios de las frecuencias dominante son mayores en *H. pulchellus* que en *H. cordobae*.

En la Tabla 30 se muestran las medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. pulchellus* para los cantos de una nota y dos notas.

Tabla 30. Medias y desvíos de las variables analizadas para *H. pulchellus*, para cantos de una y dos notas.

Variables	Cantos de 1 Nota	Cantos de 2 Notas
DC	38,62 ± 12,86	132,91 ± 31,47
DN1		16,59 ± 4,96
IN1		77,26 ± 31,07
DN2		37,32 ± 6,85
FDC	2162,22 ± 305,02	2331,99 ± 213,94
FD1		2212,89 ± 273,29
FD2		2345,24 ± 207,01

Para *H. pulchellus* fue posible analizar 16 sonidos simples emitidos por 11 individuos. Estos sonidos presentaron una duración promedio de 71,38 ± 19,34ms, con un rango entre 43 y 105ms de duración, y la FD osciló entre los 1392,2 y los 2300 Hz (1781,01 ± 372.89 Hz). En estos sonidos se observa que la duración es mayor a las de las notas del canto del mismo individuo. Las frecuencias dominantes (FD) de los sonidos simples siempre son menores a los de los cantos emitidos por el mismo individuo.

A partir de los datos obtenido para cada localidad, que se presentan en la Tabla 31, se realizó un análisis comparativo entre las tres poblaciones de *H. pulchellus* estudiadas, utilizando seis variables temporales (DC, DN1, DN2, DN3, IC y TC) y tres variables espectrales (FDC, FD1, FD2).

Tabla 31. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. pulchellus*, para cada localidad estudiada.

VARIABLES	Río Cuarto (n = 19)	Las Acequias (n = 11)	Alejandro Roca (n = 13)
DC	161,81 ± 31,66	118,35 ± 16,48	117,57 ± 12,51
DN1	16,71 ± 4,28	17,34 ± 4,37	14,16 ± 2,63
IN1	108,16 ± 27,60	59,83 ± 17,62	66,59 ± 11,46
DN2	35,21 ± 5,72	39,39 ± 3,99	35,69 ± 4,39
IC	477,62 ± 254,46	346,5 ± 83,93	922,67 ± 363,81
FDC	2367,08 ± 177,54	2243,70 ± 211,48	2508,10 ± 106,60
FD1	2289,90 ± 177,54	2119,96 ± 283,86	2247,49 ± 203,42
FD2	2375,02 ± 100,27	2258,77 ± 215,72	2508,43 ± 106,34
TC	80,82 ± 37,3	130 ± 40,95	86 ± 38,61

Del análisis de ANOVA realizado ($n = 43$), todas las variables mostraron diferencias significativas, excepto la DN1, DN2 y FD1 ($p < 0.05$; nivel de confianza del 95%) (Tabla 32).

Tabla 32. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de *H. pulchellus* para las tres poblaciones estudiadas. El asterisco indica las variables en las que las diferencias no fueron significativas.

Variable	p	F
DC	0,0000	16,64
DN1	0,1223*	2,23
DN2	0,0999*	2,45
IN1	0,0000	21,51
IC	0,0180	6,92
FDC	0,0033	6,71
FD1	0,1217*	2,23
FD2	0,0007	8,91
TC	0,0053	6,06

Del test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las poblaciones, se obtuvieron los siguientes resultados: las variables DC e IN1 muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los individuos de las poblaciones de Las Acequias y Alejandro Roca, pero si existe diferencias significativas entre estas dos y Río Cuarto. La TC muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas

entre los individuos de las poblaciones de Río Cuarto y Alejandro Roca, pero si existe diferencias significativas entre estas dos y Las Acequias. Mientras que en el caso de la FD2 muestra diferencias significativas entre las tres poblaciones estudiadas. Para el caso de la FDC e IC muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los individuos de las poblaciones de Las Acequias y Río Cuarto, pero si existe diferencias significativas entre estas dos y Alejandro Roca. En el gráfico de la Figura 56 puede observarse que para la localidad de Alejandro Roca la FDC muestra valores mayores a los de las demás poblaciones.

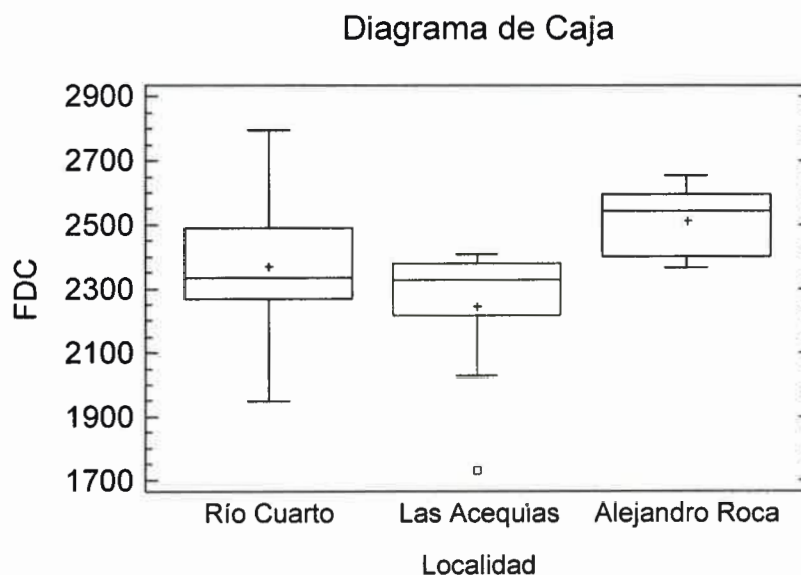


Figura 56. Variación de la FDC entre individuos de las tres poblaciones estudiadas de *H. pulchellus*. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea vertical muestra el rango y la cruz indica el promedio.

Las regresiones simples, entre cada variables y la temperatura del aire mostraron que la DC, DN2, IN1 y TC varían en función de la temperatura, y fueron ajustadas a 17°C (DC: $r=-0,734065$, $R^2=53,88\%$, $p=0,0000$; DN2: $r=0,341292$, $R^2=11,64\%$, $p=0,0311$; IN1: $r=-0,783733$, $R^2=61,42\%$, $p=0,0000$; TC: $r=0,47715$, $R^2=22,76\%$, $p=0,0019$). La DN1, FDC, FD1, FD2, e IC no varían en función de la temperatura (DN1: $r=-0,159201$, $R^2=2,53\%$, $p=0,3265$; FDC: $r=0,255473$, $R^2=6,52\%$, $p=0,1116$; FD1: $r=0,0822681$, $R^2=0,67\%$, $p=0,6138$; FD2: $r=0,204759$, $R^2=4,19\%$, $p=0,2070$; IC: $r=-0,420933$, $R^2=17,71\%$, $p=0,1973$).

Del análisis discriminante se obtuvieron dos funciones altamente significativas ($p = 0,0000; 0,0346$), la primera con un Eigenvalue de 1,30 explica el 69,62% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,75260; λ de Wilks = 0,276172), mientras que la segunda función discriminante con un Eigenvalue de 0,57 explica el 30,38% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,60254; λ de Wilks = 0,636941),

A continuación se presenta la tabla de clasificación (Tabla 33) en la cual se muestra que el porcentaje de individuos correctamente clasificados fue de 87,50%. Para las tres localidades el porcentaje de clasificación erróneas es bajo, menor al 20%. En la Figura 57 se observa la distribución de los individuos de las tres localidades de acuerdo a las funciones discriminante 1 y 2.

Tabla 33. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables acústicas de *H. pulchellus* para las tres poblaciones estudiadas.

Grupo Actual	n	Localidad		
		Río Cuarto	Alejandro Roca	Las Acequias
Río Cuarto	18	16 (88,89%)	1 (5,56%)	1 (5,56%)
Alejandro Roca	12	0	11 (91,67%)	1 (8,33%)
Las Acequias	10	1 (10%)	1 (10%)	8 (80%)

Diagrama de las Funciones Discriminantes

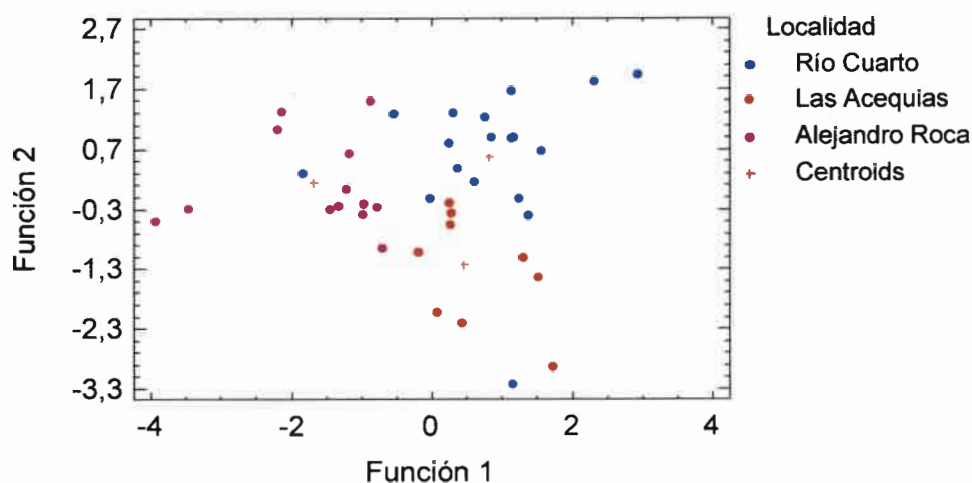


Figura 57. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables acústicas de *H. pulchellus* para las tres poblaciones estudiadas.

Hypsiboas riojanus (Koslowsky, 1895)

Morfometría

La coloración más frecuente observada en esta especie es el verde claro sin manchas, aunque también se observaron individuos de un color verde/amarronado con manchas redondeadas no concluyentes (Figuras 58 y 59). En las partes internas de las patas se observó también una coloración particular, que consiste en un fondo claro color crema (o blanco) sobre el cual se observa un irregular punteado marrón oscuro. El vientre mostró un color crema o amarillo pálido.



Figura 58. *H. riojanus*, vista lateral. Ejemplar macho, Sañogasta, La Rioja.



Figura 59. *H. riojanus*, vista lateral. Ejemplar macho, Sañogasta, La Rioja.

La Tabla 34 muestra la media, desvíos, máximo y mínimo correspondiente a 15 variables morfométricas ordenadas por sexo, las cuales fueron relevadas en un total de 18 individuos (17♂/1♀), pertenecientes a la localidad de Sañogasta (29° 19' 20''; 67° 35' 32''), La Rioja.

Los machos adultos y sexualmente activos al momento de las capturas mostraron una longitud total promedio de 53,02mm. El largo promedio de la cabeza (17,43mm) corresponde al 32,87% de la longitud total, y es algo mayor a su ancho (16,20mm); mostrando un índice cefálico (ancho de la cabeza/largo de la cabeza) de 0,93.

Para el caso de las hembras, mostraron en promedio SVL mayores a los de los machos (58,48mm).

Tabla 34. Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) de *H. riojanus* (17♂/1♀).

Variables	Media ± Desvío (rango) ♂	Media ± Desvío (rango) ♀
SVL	53,02 ± 4,37 (41,43-58,74)	58,48
HW	16,20 ± 1,38 (12,88 -17,54)	17,06
LC	17,43 ± 1,54 (13,07-19,31)	17,86
HO	6,80 ± 0,59 (5,55-7,46)	6,63
IN	4,43 ± 0,42 (3,75-5,20)	4,74
IO	5,37 ± 0,49 (4,35-6,25)	6,09
ON	4,34 ± 0,42 (3,39-4,96)	4,52
RN	2,75 ± 0,46 (2,01-3,50)	2,51
DO	5,60 ± 0,62 (4,46-6,31)	5,62
LB	27,12 ± 2,60 (21,77-30,71)	28,54
TF	12,01 ± 1,18 (9,88-13,91)	13,18
LF	28,40 ± 2,17 (22,46-30,65)	30,16
LT	28,05 ± 2,14 (22,12-30,58)	30,36
LP	39,08 ± 3,08 (30,39-42,40)	42,11
CT	17,15 ± 1,73 (13,09-19,30)	17,69

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilks indicó que de las 15 variables analizadas, presentaron una distribución no normal ocho de ellas: el ancho de la cabeza, el largo de la cabeza, distancia hocico-ojo, diámetro del ojo, largo del fémur, largo de la tibia, largo de la pata y largo del cuarto dígito posterior. En la Tabla 35 se presentan los valores de p y del estadístico W para cada variable analizada.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

Tabla 35. Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos y hembras de *H. riojanus*. W representa el estadístico Shapiro-Wilk y p la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.

Variable	W	P
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,913136	0,115005
Ancho de la cabeza (HW)	0,807026	0,00202514*
Largo cabeza (LC)	0,809514	0,00221456*
Distancia hocico-ojo (HO)	0,86272	0,0160646*
Distancia internarinas (IN)	0,97056	0,803555
Distancia interocular (IO)	0,91017	0,102411
Distancia ojo-narina (ON)	0,968824	0,773787
Distancia rostro-narina (RN)	0,95424	0,517999
Diámetro del ojo (DO)	0,816361	0,00283668*
Largo del brazo (LB)	0,9084	0,0955484
Largo del fémur (LF)	0,76172	0,000418054*
Largo del 3 ^{er} dígito anterior (TF)	0,956947	0,563275
Largo de la tibia (LT)	0,749231	0,000275046*
Largo de la pata (LP)	0,824396	0,003804*
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	0,877586	0,0285534*

Debido a que se cuenta con solo un individuo hembra, no se realizaron comparaciones morfométricas entre sexos.

Eritrometría

En la Tabla 36 se resumen los valores medios y desvíos estándar de las medidas de tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos de los individuos analizados para la localidad de Sañogasta.

Tabla 36. Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos.

Localidad	N	Largo del Eritrocito (μm)	Ancho del Eritrocito (μm)	Área del Eritrocito (μm^2)	RE	Largo del núcleo (μm)	Ancho del núcleo (μm)	Área del núcleo (μm^2)	RN
Sañogasta <i>H. riojanus</i> Media \pm desvío (rango)	11	20,43 \pm 0,96 (18,62-22,07)	13,80 \pm 0,59 (12,3-14,52)	221,70 \pm 14,50 (198,16-251,89)	1,48 \pm 0,10 (1,32-1,66)	8,56 \pm 0,51 (7,84-9,47)	4,58 \pm 0,25 (4,11-4,89)	30,88 \pm 2,94 (26,01-35,68)	1,87 \pm 0,11 1,70-2,03

En *H. riojanus* la correlación entre el tamaño de los eritrocitos (Área) y el largo hocico-cloaca (SVL), como así también la correlación entre el tamaño del núcleo (Área) y el SVL, no resultó significativa (Área del eritrocito-SVL: $p = 0,6473$, $r = -0,165726$, $F = 0,23$; Área del núcleo-SVL: $p = 0,9529$, $r = -0,0215398$, $F = 0,00$) (Figura 60).

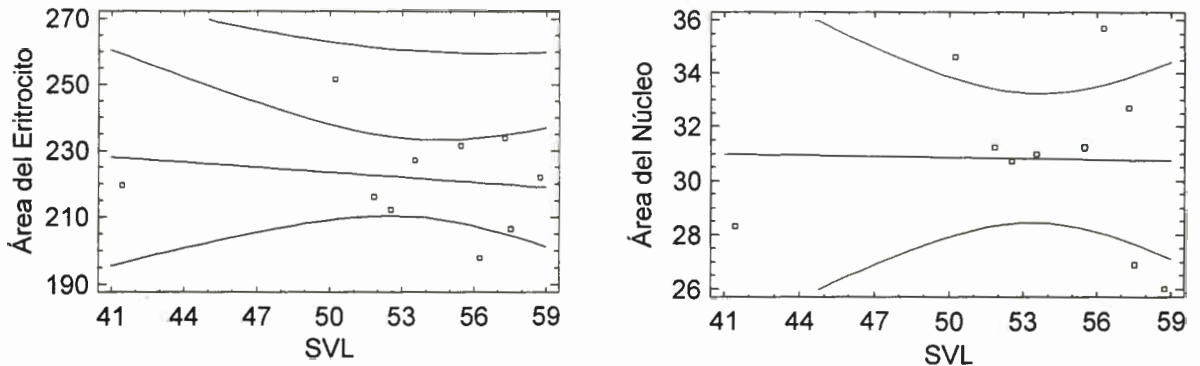


Figura 60. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en *H. riojanus*.

Citogenética

Se obtuvieron fotografías de células correspondientes a seis individuos; 20 células en diacinesis y tres en metafase II, a partir de las cuales se pudo determinar que el nivel de ploidía para esta especie es de $2n = 2x = 24$, al igual que en las dos especies anteriores.

Para *H. riojanus* en las figuras meióticas, los bivalentes también formaron anillos con dos quiasmas terminales; sin embargo, a diferencia de las dos especies anteriores, no se encontró la formación de cadenas en el par de cromosomas 1 (Figura 61).

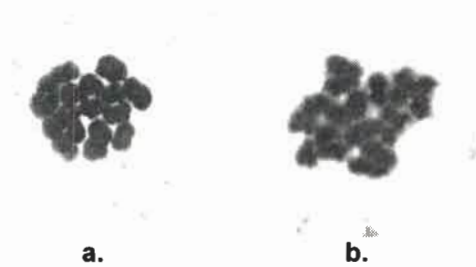


Figura 61. a. Diacinesis con 12 bivalentes; b. Meiosis II con 12 cromosomas. Sañogasta.

Bioacústica

Los individuos de *H. riojanus* fueron observados vocalizando en diferentes microambientes: fuera del agua, sobre la vegetación acuática, semi-sumergidos en el agua, sujetados con las extremidades anteriores a la vegetación o sobre cortaderas o ramas.

Se analizaron un total de 140 cantos en 17 individuos de *H. riojanus*. Los promedios generales de la especie para cada variable acústica analizada se muestran en la Tabla 37. Se observa una duración de canto promedio de 255,57ms; y en las notas se observa que la primera nota tiene mayor duración que las restantes. Los intervalos entre notas varían entre 35,87 y 51,47ms, por lo general con valores mayores a los de las notas del canto. La Frecuencia Dominante promedio del canto es de 1712,22 Hz, correspondiéndose, por lo general con la frecuencia de la última nota. En la frecuencia de cada nota, la frecuencia de la primera nota es mayor que la de las restantes (Tabla 37).

Tabla 37. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. riojanus*.

VARIABLES	Media
DC	255,57 ± 42,83
DN1	46,38 ± 19,25
IN1	51,47 ± 9,55
DN2	33,73 ± 12,06
IN2	41,65 ± 8,03
DN3	34,37 ± 9,86
IN3	36,05 ± 7,23
DN4	32,29 ± 11,97
IN4	35,87 ± 9,75
DN5	44,33 ± 8,17
IC	1411,93 ± 297,05
FDC	1712,22 ± 296,65
FD1	1676,99 ± 263,71
FD2	1689,51 ± 297,03
FD3	1670,55 ± 286,39
FD4	1651,17 ± 303,65
FD5	1527,31 ± 241,87

Respecto a los intervalos entre cantos, esta especie presentó un valor promedio de 1411,93ms, con un rango entre 1108,80-1702,5ms. La Tasa de Canto promedio fue de 44,29 c/m, con un rango entre 21 c/m y 69 c/m.

Al igual que *H. codobae*, esta especie presentó cuatro tipos de cantos de advertencia de dos, tres, cuatro y cinco notas, los cuales se alternaron regularmente de ocho maneras diferentes:

1. individuos con cantos de tres notas alternados con cantos de cuatro notas (Figura 62);
2. individuos con cantos de cuatro notas alternados con cantos de cinco notas
3. individuos con solo cantos de cuatro notas
4. individuos con cantos de tres, cuatro y cinco notas alternados regularmente
5. individuos con cantos de dos notas alternados con cantos de tres notas
6. individuos con cantos de dos, tres y cuatro notas alternados regularmente
7. individuos con cantos de tres notas alternados con cantos de cinco notas
8. individuos con solo cantos de tres notas



Figura 62. Canto de advertencia de *H. riojanus* con cantos de tres y cuatro notas.

De los 141 cantos analizados un 46,81% (66) fueron cantos de tres notas, un 27,66% (39) de cantos de cuatro notas, un 18,44% (26) cantos de cinco notas, y un 7,09% de cantos de dos notas.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

De los 17 individuos, cuatro de ellos presentaron cantos de tres y cuatro notas intercaladas; cuatro presentaron cantos solo de tres notas; tres presentaron cantos de tres, cuatro y cinco notas intercaladas; dos presentaron cantos de cuatro y cinco notas intercaladas; un individuo presentó solo cantos con cuatro notas, otro individuo presento cantos de dos y tres notas intercaladas, otro individuo presento cantos de dos, tres, y cuatro notas intercaladas, y el individuo restante presentó cantos de tres notas intercaladas con cantos de cinco notas (Tabla 38).

Tabla 38. Número de individuos y las diferentes maneras en las que se alternan lo tipos de canto.

	Número de Notas por Canto							
	3	4	2-3	3-4	4-5	3-5	2-3-4	3-4-5
Nº de individuos	4	1	1	4	2	1	1	3
Total	17							

En la Tabla 39 se muestran las medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. riojanus* para los cantos de una nota y dos notas.

Tabla 39. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. riojanus* en cada tipo de canto.

Variables	Cantos de 2 Notas	Cantos de 3 Notas	Cantos de 4 Notas	Cantos de 5 Notas
DC	119,60 ± 27,40	227,92 ± 50,70	264,87 ± 48,16	284,12 ± 32,97
DN1	12,90 ± 4,58	51,09 ± 25,20	50,08 ± 22,18	20,92 ± 4,80
IN1	50,30 ± 6,62	52,33 ± 16,32	53,95 ± 15,34	40,31 ± 8,69
DN2	48 ± 5,72	30,92 ± 11,79	29,26 ± 15,28	21,54 ± 8,64
IN2		46,79 ± 16,51	29,92 ± 12,72	34,65 ± 5,95
DN3		41,35 ± 11,80	25,54 ± 10,67	21,15 ± 5,64
IN3			38,79 ± 9,97	33,50 ± 4,78
DN4			33,44 ± 11,77	24,62 ± 7,72
IN4				36,08 ± 9,15
DN5				46,50 ± 9,86
FDC	2079,80 ± 113,26	1674,08 ± 328,78	1949,58 ± 108,23	1273,44 ± 361,01
FD1	1904,88 ± 85,50	1682 ± 329,58	1825,94 ± 106,16	1197,44 ± 294,64
FD2	2079,80 ± 113,26	1668,56 ± 343,71	1929,58 ± 70,68	1217,15 ± 316,92
FD3		1716,82 ± 322,11	1815,28 ± 248,74	1238,14 ± 330,68
FD4			1857,83 ± 90,59	1248,58 ± 353,20
FD5				1388,48 ± 216,93

Se observó la presencia del sonido simple. Se analizaron 13 sonidos simples, los cuales presentaron una duración promedio de $110,92 \pm 34,46\text{ms}$ (81-201) y una frecuencia dominante de $1492,29 \pm 372,21\text{ Hz}$ (947,4-1937).

Hypsiboas andinus (Müller, 1926)

Morfometría

Para esta especie la coloración observada fue la de verde claro, sin machas, con el vientre de color crema o amarillo pálido. En las partes internas de las patas se observó también una coloración particular, que consiste en un fondo claro color crema (o blanco) sobre el cual se observa un irregular punteado marrón oscuro.

En esta especie además se pudo observar una banda crema, irregular, a cada lado del cuerpo, desde el ángulo posterior de los ojos hasta las proximidades de la inserción de los miembros posteriores; continua (aunque de márgenes irregulares) interrumpida por manchas amarronadas (Figuras 63 y 64).



Figura 63. *H. andinus*, vista dorsal. Ejemplar macho, Amaichá del Valle, Tucumán.



Figura 64. *H. andinus*, vista lateral. Ejemplar macho, Amaichá del Valle, Tucumán.

Se relevaron 12 individuos (11♂/1♀), pertenecientes a la localidad de Amaichá del Valle (26° 37' 34.4''; 65° 52' 15.6''), Tucumán. A continuación se presenta la Tabla 40, con la media, desvíos, máximo y mínimo de las 15 variables morfométricas analizadas por sexo.

Tabla 40. Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) de *H. andinus* (11♂/1♀).

Variables	Media ± Desvío (rango) ♂	Un Individuo ♀
SVL	52,58 ± 2,89 (48,58-55,71)	58,08
HW	15,68 ± 0,83 (14,25 -16,72)	16,62
LC	17,50 ± 0,84 (15,48-18,32)	18,6
HO	6,74 ± 0,33 (6,25-7,32)	6,7
IN	4,07 ± 0,29 (3,75-4,55)	4,73
IO	5,59 ± 0,55 (4,63-6,28)	5,15
ON	4,31 ± 0,36 (3,67-4,93)	4,5
RN	2,80 ± 0,43 (2,18-3,41)	2,55
DO	5,59 ± 0,40 (4,97-6,07)	5,91
LB	26,63 ± 1,87 (22,84-28,86)	27,98
TF	12,25 ± 1,60 (9,94-14,91)	13,27
LF	28,29 ± 1,39 (26,22-30,92)	30,25
LT	28,04 ± 1,76 (25,69-31,27)	30,75
LP	39,88 ± 2,50 (36,39-43,50)	44,18
CT	16,24 ± 1,35 (14,61-18,47)	18,68

Los machos adultos y sexualmente activos al momento de las capturas mostraron una longitud total promedio de 52,58mm. El largo promedio de la cabeza (17,50mm) corresponde al 33,28% de la longitud total, y es algo mayor a su ancho (15,68mm); mostrando un índice cefálico (ancho de la cabeza/largo de la cabeza) de 0,89.

Para el caso de las hembras, mostraron en promedio SVL mayor a los de los machos. (58,08mm).

En la Tabla 41 se presentan los valores de p y del estadístico W para cada variable analizada. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilks indicó que las 15 variables estudiadas en esta especie tienen una distribución normal.

Tabla 41. Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos y hembras de *H. andinus*. W representa el estadístico Shapiro-Wilk y p la probabilidad ($\alpha = 0,05$).

Variable	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,956427	0,678926
Ancho de la cabeza (HW)	0,944686	0,521055
Largo cabeza (LC)	0,910699	0,207263
Distancia hocico-ojo (HO)	0,910633	0,206873
Distancia internarinas (IN)	0,884492	0,0956441
Distancia interocular (IO)	0,991036	0,998004
Distancia ojo-narina (ON)	0,969612	0,85585
Distancia rostro-narina (RN)	0,961567	0,750486
Diámetro del ojo (DO)	0,863676	0,0513281
Largo del brazo (LB)	0,969118	0,849835
Largo del fémur (LF)	0,964698	0,793052
Largo del 3 ^{er} dígito anterior (TF)	0,940867	0,474125
Largo de la tibia (LT)	0,928658	0,343987
Largo de la pata (LP)	0,927702	0,335121
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	0,948625	0,572118

Eritrometría

En la Tabla 42 se resumen los valores medios y desvíos estándar de las medidas de tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos de los individuos analizados de *H. andinus* de la localidad de Amaichá del Valle.

En esta especie la correlación entre el tamaño de los eritrocitos (Área) y el largo hocico-cloaca (SVL), como así también la correlación entre el tamaño del núcleo (Área) de los eritrocitos y el SVL, no resultó significativa (Área del eritrocito-SVL: $p = 0,6799$, $r = 0,149615$, $F = 0,18$; Área del núcleo-SVL: $p = 0,9708$, $r = 0,0133422$, $F = 0,00$) (Figura 65).

Tabla 42. Medias y desvíos correspondientes a las variables largo, ancho y área de los eritrocitos y sus núcleos de *H. andinus*.

Localidad	N	Largo del Eritrocito (μm)	Ancho del Eritrocito (μm)	Área del Eritrocito (μm^2)	RE	Largo del núcleo (μm)	Ancho del núcleo (μm)	Área del núcleo (μm^2)	RN
Amaichá del Valle <i>H. andinus</i> Media \pm desvío (rango)	10	20,74 \pm 0,93 (19,41-23,12)	14,14 \pm 0,37 (13,60-14,92)	230,68 \pm 15,29 (218,76-271,76)	1,47 \pm 0,06 (1,35-1,55)	8,17 \pm 0,45 (7,63-8,94)	4,26 \pm 0,30 (3,72-4,77)	27,42 \pm 3,36 (22,94-32,90)	1,92 \pm 0,09 (1,80-2,11)

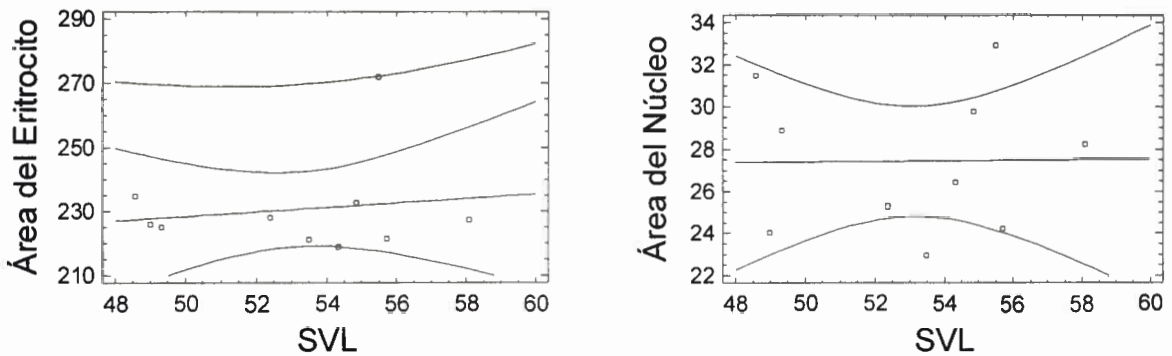


Figura 65. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda) y Área del Núcleo (derecha) versus el SVL en *H. andinus*.

Citogenética

Se obtuvieron fotografías de células correspondientes cuatro individuos; a partir de las cuales se pudo determinar que el nivel de ploidía para esta especie es de $2n = 2x = 24$, al igual que en las otras tres especies. Esta determinación se realizó en base al análisis meiótico de células en diacinesis y metafase II; entre las cuales se obtuvieron un total de 22 células en diacinesis y 5 células en metafase II (Figura 66).

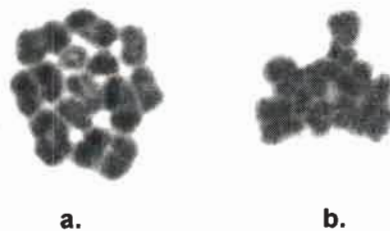


Figura 66. a. Diacinesis con 12 bivalentes; b. Meiosis II con 12 cromosomas. Amaichá del Valle.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

En cuanto a las figuras meióticas, al igual que en *H. riojanus*, los bivalentes forman solo anillos, presentando dos quiasmas terminales, no habiéndose encontrado células en las que el par de cromosomas 1 presentara una configuración abierta en forma de cadena.

Bioacústica

Los individuos de esta especie se los observó cantando en la orilla del cuerpo de agua, sobre la vegetación, sobre vegetación acuática, y también semi-sumergidas amarradas a vegetación.

Para *H. andinus* se analizaron 90 cantos de 11 individuos. Los promedios generales de la especie para cada variable acústica analizada se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. andinus*.

Variables	Media
DC	225,18 ± 36,13
DN1	44,09 ± 25,02
IN1	54,78 ± 9,46
DN2	17,36 ± 1,90
IN2	46,84 ± 7,13
DN3	32,32 ± 10,26
IN3	42,49 ± 5,69
DN4	36,77 ± 18,18
IN4	42,19 ± 1,68
DN5	44,63 ± 25,99
IN5	48,67
DN6	28,33
IN4	56
DN7	49
IC	447,33 ± 343,77
FDC	1731,38 ± 255,18
FD1	1715,78 ± 254,22
FD2	1697,11 ± 225,82
FD3	1724,29 ± 245,40
FD4	1632,75 ± 293,55
FD5	1730,06 ± 231,84
FD6	1521,33
FD7	1507

Se observa una duración de canto promedio de 225,18ms; y en las notas se observa que la primera nota tiene mayor duración que las restantes. Los intervalos entre notas varían entre 49,19 y 56ms por lo general con valores mayores a los de las notas del canto. En cuanto a frecuencias, la frecuencia promedio del canto es de 1731,38 Hz, correspondiéndose, por lo general con la frecuencia de la última nota (Tabla 43).

Los intervalos entre cantos para esta especie se midió en un solo individuo, presentando un valor medio de $447,33 \pm 343,77$ ms, con un rango entre 132-106 ms; mientras que para la Tasa de Canto, el valor medio fue de 36 c/m, con un rango entre 20 c/m y 78 c/m.

Se determinaron cantos de tres, cuatro, cinco, seis y siete notas, los cuales se alternan regularmente de cuatro maneras diferentes, habiéndose encontrado:

1. individuos solo con cantos de tres notas
2. individuos con cantos de tres, cuatro y cinco notas alternados regularmente (Figura 67)
3. individuos con cantos de tres notas alternados con cantos de cuatro notas
4. individuos con cantos de cuatro, cinco, seis y siete notas alternados.



Figura 67. Canto de advertencia de *H. andinus* con cinco, cuatro y tres notas.

De los 90 cantos analizados un 77,77% (70) de cantos de tres notas, 12,22% (11) fueron cantos de cuatro notas, un 6,67% (6) cantos de cinco notas, un 2,22% (2) canto compuesto de seis notas, y solo un canto de siete notas.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

De los 11 individuos, seis presentaron solo cantos de tres notas; tres presentaron cantos de tres y cuatro notas; un individuo presentó cantos de tres, cuatro y cinco notas intercaladas; y el individuo restante presentó cantos de cuatro, cinco, seis y siete notas intercaladas.

En la Tabla 44 se muestran las medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. andinus* para los cuatro tipos de cantos.

Tabla 44. Medias y desvíos de las variables acústicas analizadas para *H. andinus* en cada tipo de canto.

Variables	Cantos de 3 Notas	Cantos de 4 Notas	Cantos de 5 Notas	Cantos de 6 Notas	Cantos de 7 Notas
DC	219,04 ± 31,50	239 ± 34,16	271 ± 18,45	352,50 ± 19,09	430
DN1	55,59 ± 23,28	21,82 ± 16,45	14,33 ± 4,80	21,50 ± 2,12	19
IN1	56,74 ± 11,18	47,73 ± 8,28	40,67 ± 5,85	42 ± 1,41	38
DN2	17,61 ± 3,17	16,73 ± 3,41	14,83 ± 4,58	21,50 ± 3,54	18
IN2	47,40 ± 8,15	41,45 ± 5,32	43,17 ± 5,23	40 ± 2,83	44
DN3	38,93 ± 12,21	18,64 ± 5,08	15,33 ± 1,37	18,50 ± 3,54	16
IN3		43 ± 7,47	43,83 ± 3,66	44 ± 2,83	44
DN4		41,20 ± 25,59	13,83 ± 2,64	15	12
IN4			41 ± 16,70	47 ± 1,41	48
DN5			38,50 ± 14,56	13,50 ± 0,71	15
IN5				49 ± 4,24	48
DN6				35 ± 21,21	15
IN6					56
DN7					49
FDC	1789,86 ± 232,31	1688,36 ± 284,96	1614,50 ± 145,82	1528,50 ± 30,41	1507
FD1	1798,53 ± 196,36	1585 ± 284,96	1571,50 ± 108,21	1464	1378
FD2	1742,76 ± 198,36	1670,30 ± 214,55	1610,20 ± 168,20	1485,50 ± 30,41	1378
FD3	1776,87 ± 231,35	1671,09 ± 260,42	1607,33 ± 123,63	1550	1593
FD4		1691,09 ± 243,63	1614,50 ± 167,09	1593	1593
FD5			1628,83 ± 139,78	1550	1550
FD6				1528,50 ± 30,41	1507
FD7					1507

Para *H. andinus* se analizaron sonido simple de tres individuos. Estos sonidos presentaron una duración promedio de $113,8 \pm 22,08$ ms, y la FD $1724 \pm 145,41$ Hz.

En estos sonidos se observa que la duración es mayor a las de las notas del canto del mismo individuo, y para el caso de las FD, las frecuencias de estos sonidos simples son similares a la de los cantos emitidos por el mismo individuo.

COMPARACIÓN ENTRE ESPECIES

MORFOMETRÍA

Se analizaron un total de 159 individuos de las cuatro especies en estudio (Tabla 45). Doce variables morfométricas de *H. cordobae* mostraron diferencias significativas entre machos y hembras. Además, en las tres especies restantes (*H. pulchellus*, *H. riojanus* e *H. andinus*) el número de hembras es bajo, por lo tanto, los análisis se realizaron solo con datos correspondientes a individuos machos.

Tabla 45. Media, desvío, máximo y mínimo de cada variable morfológica (mm) para cada especie estudiada.

Variables	<i>H. pulchellus</i>	<i>H. cordobae</i>	<i>H. riojanus</i>	<i>H. andinus</i>
SVL	43,39 ± 3,70 (31,59-51,47)	50,02 ± 3,94 (41,30-61,23)	53,02 ± 4,37 (41,43-58,74)	52,58 ± 2,89 (48,58-55,71)
HW	11,84 ± 1,14 (8,52-13,80)	14,63 ± 1,30 (12,30 -18,47)	16,20 ± 1,38 (12,88 -17,54)	15,68 ± 0,83 (14,25 -16,72)
LC	13,88 ± 0,91 (11,38-15,46)	15,72 ± 1,44 (11,42-19,84)	17,43 ± 1,54 (13,07-19,31)	17,50 ± 0,84 (15,48-18,32)
ON	3,60 ± 0,44 (2,64-4,92)	3,97 ± 0,51 (2,67-5,09)	4,34 ± 0,42 (3,39-4,96)	4,31 ± 0,36 (3,67-4,93)
DO	4,60 ± 0,43 (3,38-5,46)	5,13 ± 0,46 (4,08-6,62)	5,60 ± 0,62 (4,46-6,31)	5,59 ± 0,40 (4,97-6,07)
LB	20,32 ± 1,72 (14,45-24,14)	23,98 ± 2,35 (19,63-29,44)	27,12 ± 2,60 (21,77-30,71)	26,63 ± 1,87 (22,84-28,86)
TF	8,98 ± 1,05 (5,39-11,20)	10,12 ± 1,38 (7,35-13,20)	12,01 ± 1,18 (9,88-13,91)	12,25 ± 1,60 (9,94-14,91)
LF	21,96 ± 1,99 (15,75-25,51)	25,60 ± 2,52 (19,63-30,19)	28,40 ± 2,17 (22,46-30,65)	28,29 ± 1,39 (26,22-30,92)
LT	22,07 ± 1,92 (16,26-25,78)	25,41 ± 2,21 (20,36-30,46)	28,05 ± 2,14 (22,12-30,58)	28,04 ± 1,76 (25,69-31,27)
LP	31,62 ± 3,04 (21,54-36,89)	35,61 ± 3,28 (24,37-41,94)	39,08 ± 3,08 (30,39-42,40)	39,88 ± 2,50 (36,39-43,50)
CT	12,76 ± 1,65 (9,31-16,16)	14,14 ± 2,27 (10,16-19,06)	17,15 ± 1,73 (13,09-19,30)	16,24 ± 1,35 (14,61-18,47)

El SVL promedio vario entre 43,39mm en *H. pulchellus* y 53,02mm en *H. riojanus* en machos, y el valor promedio de las hembras vario entre 54,50mm en *H. cordobae* y 58,48mm en *H. riojanus*. De la misma manera, para el resto de las variables *H. pulchellus* mostró valores promedios menores, *H. cordobae* valores promedios intermedios, seguido de *H. andinus*, y luego *H. riojanus* con valores mayores, excepto

para TF y LP en los cuales los valores de *H. andinus* fueron mayores a los de *H. riojanus*.

La prueba de normalidad permitió establecer que de las 15 variables morfométricas analizadas, en siete de ellas la distribución no responde a una distribución normal (Tabla 46).

Tabla 46. Prueba de normalidad para las variables morfométricas de machos de las cuatro especies en estudio. W representa el estadístico Shapiro-Wilk y *p* la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.

Variable	W	<i>p</i>
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,985462	0,744459
Ancho de la cabeza (HW)	0,975159	0,158102
Largo cabeza (LC)	0,962114	0,00386901*
Distancia hocico-ojo (HO)	0,977913	0,274542
Distancia internarinas (IN)	0,97074	0,0542376*
Distancia interocular (IO)	0,975743	0,17914
Distancia ojo-narina (ON)	0,969676	0,0406348*
Distancia rostro-narina (RN)	0,969681	0,0406867*
Diámetro del ojo (DO)	0,985164	0,726417
Largo del brazo (LB)	0,963885	0,00700944*
Largo del fémur (LF)	0,976957	0,0147419*
Largo del 3 ^{er} dígito anterior(TF)	0,97125	0,062024
Largo de la tibia (LT)	0,974631	0,140745
Largo de la pata (LP)	0,982395	0,545681
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	0,961139	0,0027604*

De las ocho variables morfométricas comparadas mediante ANOVA, todas mostraron diferencias significativas, con $p = 0,000$ (Tabla 47); y para el caso de las variables no normales analizadas por Kruskal-Wallis también todas mostraron diferencias significativas con $p = 0,000$ (Tabla 48).

Tabla 47. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar en morfometría las cuatro especies en estudio ($n = 159$).

Variable	p	F
SVL	0,0000	51,58
HW	0,0000	92,07
HO	0,0000	20,61
IO	0,0000	22,22
DO	0,0000	33,05
TF	0,0000	41,99
LT	0,0000	61,31
LP	0,0000	45

Tabla 48. Valores de p y H del Kruskal-Wallis realizado para comparar en morfometría las cuatro especies en estudio ($n = 159$).

Variable	p	H
LC	0,0000	86,4113
IN	0,0000	60,5737
ON	0,0000	42,5614
RN	0,0000	40,7527
LB	0,0000	92,7354
LF	0,0000	85,2644
CF	0,0000	53,11

A continuación se realizó un test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar la especie entre sí. De las 15 variables analizadas 11 de ellas (Largo Hocico-cloaca (SVL), ancho de la cabeza, largo de la cabeza, distancia ojo-narina, diámetro del ojo, largo del brazo, largo del fémur, largo de la tibia, largo de la pata, largo del 3^{er} dígito anterior y largo del 4^{to} dígito posterior) muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre *H. riojanus* e *H. andinus*, pero si existe diferencias significativas entre estas dos e *H. cordobae* e *H. pulchellus*; y también muestran diferencias significativas entre *H. cordobae* e *H. pulchellus*.

Para el caso de la distancia hocico-ojo, la distancia interocular y la distancia internarina, muestran que no hay diferencias significativas entre *H. riojanus*, *H. andinus*, *H. cordobae*; pero si existen diferencias significativas entre estas tres especies e *H. pulchellus*.

Particularmente para la distancia rostro-narina, los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre *H. riojanus*, *H. andinus* e *H. pulchellus*; pero si existen diferencias significativas entre estas tres especies e *H. cordobae*.

En la Figura 68, el Scatterplot muestra que en cuanto a SVL, los individuos de *H. pulchellus* son los de menor tamaño; *H. cordobae* muestra valores intermedios; mientras que *H. riojanus* e *H. andinus* son las especies que mayor valor de SVL han presentado, y semejante entre sí.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

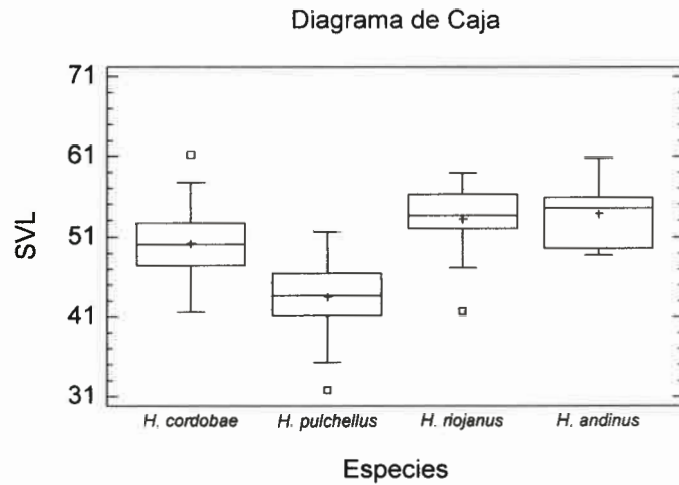


Figura 68. Variación del SVL entre las cuatro especies en estudio.
1: *H. cordobae*; 2: *H. pulchellus*; 3: *H. riojanus*; 4: *H. andinus*.

Los resultados del análisis discriminante permitieron obtener dos funciones discriminantes significativas ($p = 0,0000$; $p = 0,0000$), la primera con un Eigenvalue de 2,40 explica el 75,26% del total de la variación observada. La correlación canónica de 0,84 (cercana a 1) indica que la función tiene un alto peso, mientras que el Lambda de Wilks de 0,15 (cercano a 0) indica que las dos variables seleccionadas (LB y SVL) son buenas para discriminar (Figura 69). La segunda función discriminante con un Eigenvalue de 0,70 explica el 21,88% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,64178; λ de Wilks = 0,538824).

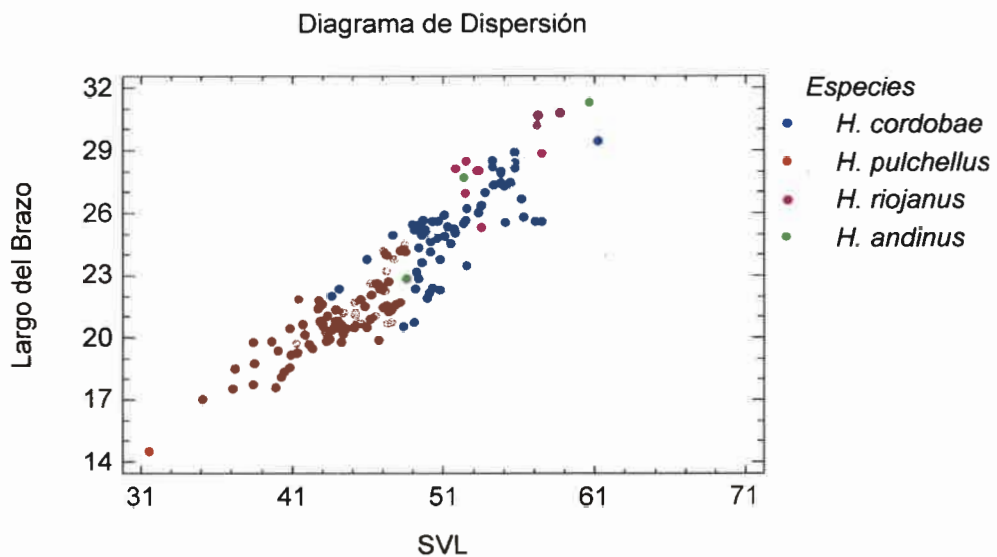


Figura 69. Distribución de los individuos de cada especie considerando dos de las variables de mayor peso.

La representación gráfica de las dos funciones discriminantes significativas, analizándola desde la Función 1 muestra una diferenciación morfológica clara entre *H. pulchellus* e *H. cordobae*, *H. riojanus*, *H. andinus* (*H. cordobae* con valores intermedios entre estos dos grupos) (Figura 70).

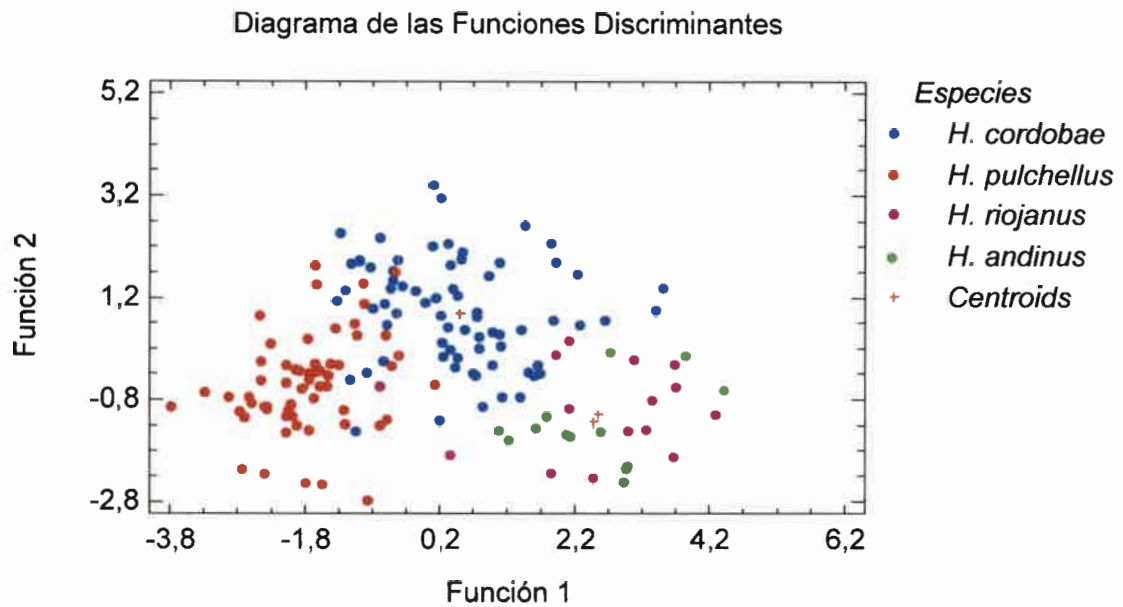


Figura 70. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables morfométricas de las cuatro especies estudiadas.

Entre las variables que tienen peso en esta función están el largo Hocico-cloaca (SVL), largo de la cabeza, distancia ojo-narina, diámetro del ojo, largo del fémur, largo de la tibia, largo de la pata y largo del 3^{er} dígito anterior, coincidiendo con las variables que separan a las especies de la misma manera cuando se realizó el test a posteriori LSD.

El porcentaje de casos correctamente clasificados fue de 81,76%, con valores altos de clasificación para cada especie (Tabla 49).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Tabla 49. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables morfométricas para las cuatro especies estudiadas: 1. *H. cordobae*; 2. *H. pulchellus*; 3. *H. riojanus*; 4. *H. andinus*.

Grupo Actual	n	Especie			
		1	2	3	4
1	72	55 (76,39%)	5 (6,94%)	6 (8,33%)	6 (8,33%)
2	59	6 (10,17%)	53 (89,83%)	0	0
3	17	0	1 (5,88%)	13 (76,47%)	3 (17,45%)
4	11	0	0	2 (18,18%)	9 (81,82%)

El análisis de agrupamiento realizado a partir de la matriz de distancias cuadradas de Mahalanobis mostró las relaciones morfométricas entre las cuatro especies estudiadas, en el que se observan dos grupos: un grupo compuesto por *H. cordobae* e *H. pulchellus*, distante de un segundo grupo compuesto por de *H. riojanus* e *H. andinus* (Figura 71).

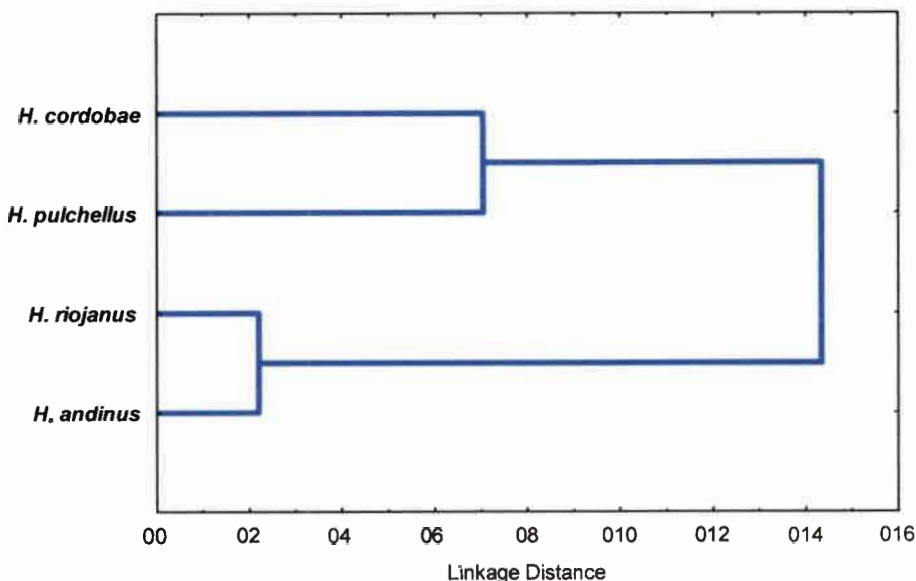


Figura 71. Dendrograma (método UPGMA) de las relaciones morfométricas entre las cuatro especies estudiadas basado en las distancias de Mahalanobis.

Para evaluar si las variables morfométricas presentan diferenciación geográfica se realizaron regresiones simples entre cada variable morfométrica y las latitudes de cada población para las cuatro especies en conjunto.

De las 15 variables morfométricas, 14 mostraron relación significativa con la latitud, y en todas el coeficiente de correlación fue negativo (Figura 72, Tabla 50).

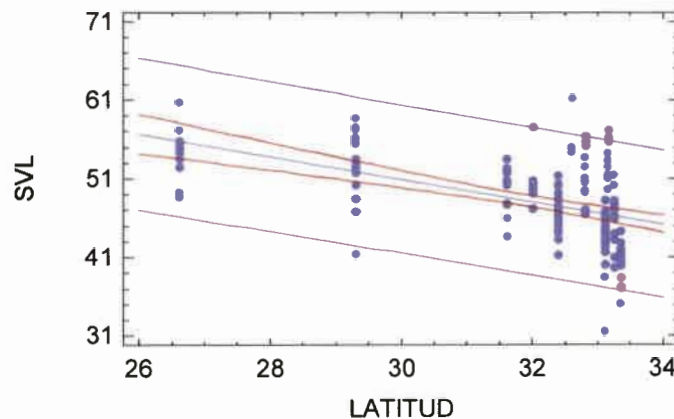


Figura 72. Regresiones lineales entre el SVL y la latitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.

Tabla 50. Análisis de correlación entre cada variable morfométrica y la latitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies. El asterisco indica la variable cuya relación con la latitud no resultó significativa.

Variable	r	R^2	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	-0,493176	24,32	0,0000
Ancho de la cabeza (HW)	-0,576048	31,18	0,0000
Largo cabeza (LC)	-0,597199	35,66	0,0000
Distancia hocico-ojo (HO)	-0,32323	10,44	0,0000
Distancia internarinas (IN)	-0,418057	17,47	0,0000
Distancia interocular (IO)	-0,283475	8,03	0,0003
Distancia ojo-narina (ON)	-0,399664	15,97	0,0000
Distancia rostro-narina (RN)	0,00573068	0,0003	0,9428*
Diámetro del ojo (DO)	-0,509705	25,97	0,0000
Largo del brazo (LB)	-0,60412	36,49	0,0000
Largo del fémur (LF)	-0,573297	32,86	0,0000
Largo del 3 ^{er} dígito anterior (TF)	-0,612327	37,49	0,0000
Largo de la tibia (LT)	-0,576058	33,18	0,0000
Largo de la pata (LP)	-0,571818	32,69	0,0000
Largo del 4 ^{to} dígito posterior (CT)	-0,556722	30,99	0,0000

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Luego se realizaron regresiones simples entre cada variable morfométrica y la altitud de cada población. De las 15 variables morfométricas, todas mostraron relación significativa con la altitud, y en todas el coeficiente de correlación fue positivo (Figura 73, Tabla 51).

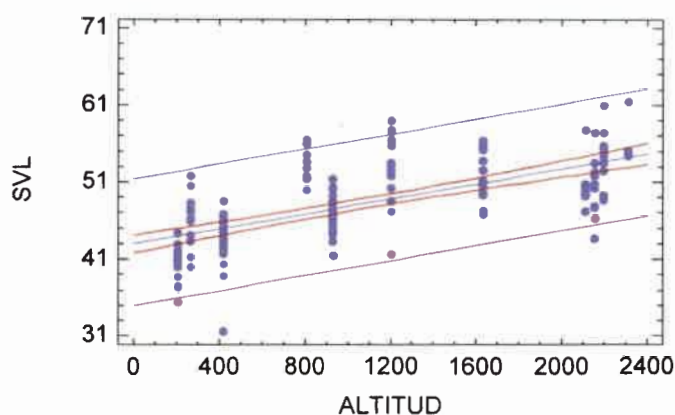


Figura 73. Regresiones lineales entre el SVL y la altitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.

Tabla 51. Análisis de correlación entre cada variable morfométrica y la altitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies.

Variable	<i>r</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>
Largo hocico-cloaca (SVL)	0,651367	42,42	0,0000
Ancho de la cabeza (HW)	0,712302	50,73	0,0000
Largo cabeza (LC)	0,640157	40,98	0,0000
Distancia hocico-ojo (HO)	0,523943	27,45	0,0000
Distancia internarinas (IN)	0,590442	34,86	0,0000
Distancia interocular (IO)	0,454077	20,61	0,0000
Distancia ojo-narina (ON)	0,507729	25,77	0,0000
Distancia rostro-narina (RN)	0,318774	10,16	0,0455
Diámetro del ojo (DO)	0,481987	23,23	0,0000
Largo del brazo (LB)	0,660775	43,66	0,0000
Largo del fémur (LF)	0,669852	44,87	0,0000
Largo del 3 ^{er} dígito anterior (TF)	0,567312	32,18	0,0000
Largo de la tibia (LT)	0,614702	37,78	0,0000
Largo de la pata (LP)	0,591155	34,94	0,0000
Largo del 4 ^o dígito posterior (CT)	0,530506	28,14	0,0000

ERITROMETRÍA

Un total de 5080 eritrocitos y sus núcleos fueron medidos, de 66 individuos de *H. cordobae*, 38 individuos de *H. pulchellus*, 11 individuos de *H. riojanus* y 10 individuos de *H. andinus*.

Se probó la normalidad de los datos y luego se realizó una comparación entre especies mediante ANOVA en los datos con distribución normal y mediante ANOVA de Kruskal-Wallis en los casos en que la normalidad fue rechazada. En la Tabla 52 se muestran los valores de p y W para la prueba de normalidad, en la que se observa que de las ocho variables, solo en tres de ellas la distribución es normal.

Tabla 52. Prueba de normalidad para las variables de eritrometría de 125 individuos de las cuatro especies estudiadas. W representa el estadístico Shapiro-Wilk y p la probabilidad ($\alpha = 0,05$). El asterisco indica las variables cuya distribución no es normal.

Variable	W	p
Largo del Eritrocito (A)	0,96856	0,0610071
Ancho del Eritrocito (B)	0,950515	0,000482353*
Área del Eritrocito (Área E)	0,931553	8,65011E-7*
Relación LE/AE (RE)	0,970964	0,101587
Largo del Núcleo (a)	0,975188	0,224153
Ancho del Núcleo (b)	0,901285	8,83138E-12*
Área del Núcleo (Área N)	0,903939	2,53505E-11*
Relación LN/AN (RN)	0,967354	0,0465512*

El análisis de ANOVA y el ANOVA de Kruskal-Wallis mostraron que en todas las variables existe una diferencia estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95% (Tablas 53 y 54) (Figura 74).

Tabla 53. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar en eritrometría las cuatro especies en estudio ($n = 125$).

Variable	p	F
A	0,0000	31,58
a	0,0000	21,93
RE	0,0000	9,68

Tabla 54. Valores de p y H del Kruskal-Wallis realizado para comparar en eritrometría las cuatro especies en estudio ($n = 125$).

Variable	p	H
B	0,0000	65,81
Área E	0,0000	76,85
b	0,0000	56,57
Área N	0,0000	57,52
RN	0,0007	16,84

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, Anura) en la región central de Argentina

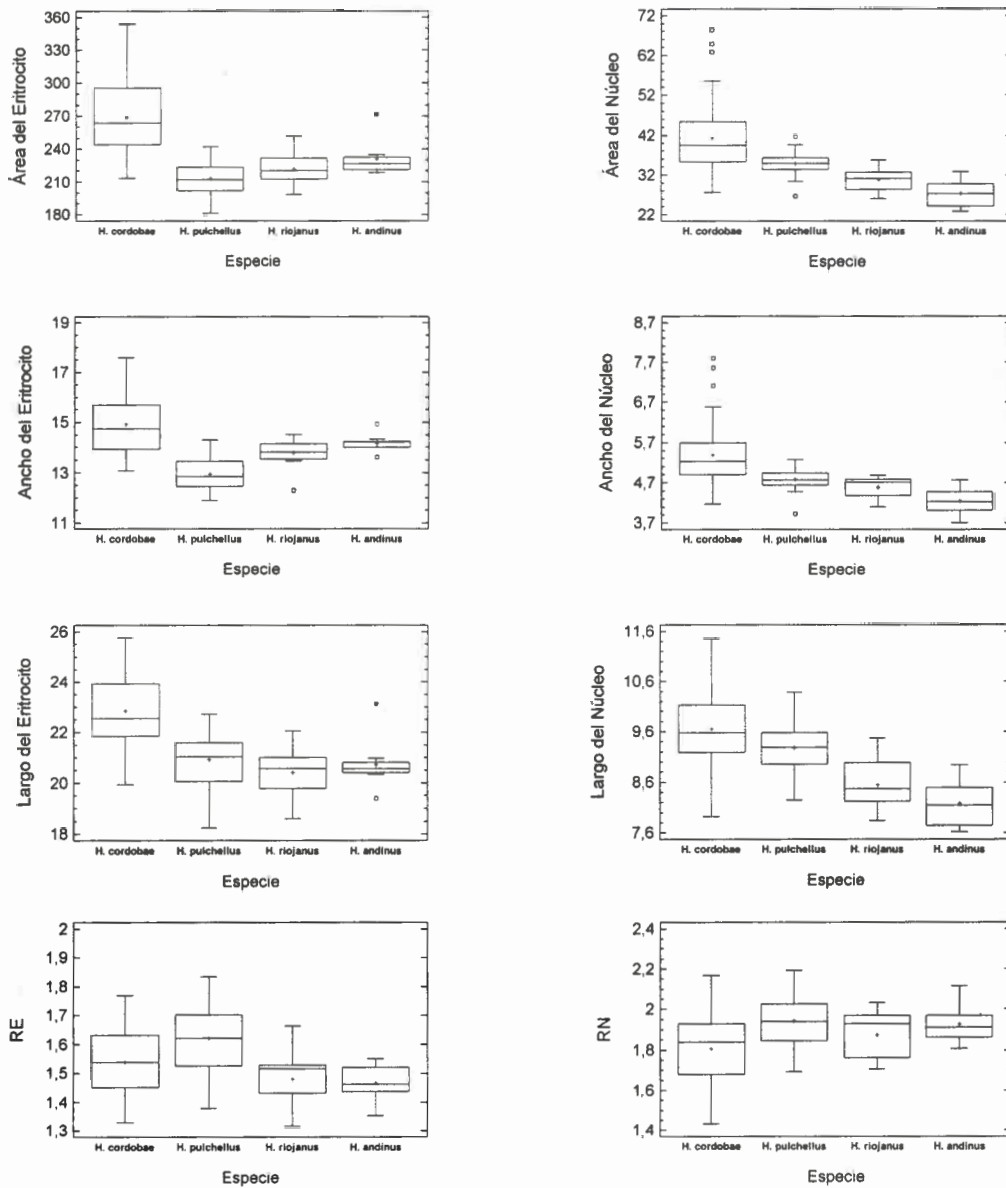


Figura 74. Diagramas de caja en el que se muestran la variación en el tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos medidos en 125 individuos de las cuatro especies estudiadas. El rectángulo representa el 50% de los datos (cuartiles 25-75%), la línea horizontal muestra el rango y la cruz indica el promedio.

Las medidas de las variables de tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos para las cuatro especies estudiadas se presentan en la Tabla 55. Observando los valores de esta tabla y los gráficos de la Figura 74 de cada variable en cada una de las especies se manifiesta que para *H. cordobae* los valores son mayores a los de las otras tres especies.

Tabla 55. Valores medios de Largo del Eritrocito (A), Largo del Núcleo (a), Ancho del Eritrocito (B), Ancho del Núcleo (b), Área del eritrocito (Área E), Área del Núcleo (Área N), en Relación A/B, Relación a/b.

Especie	A (μm)	B (μm)	Área E (μm^2)	RE	a (μm)	b (μm)	Área N (μm^2)	RN
<i>H. cordobae</i>	22,87	14,92	268,94	1,54	9,66	5,39	41,22	1,81
<i>H. pulchellus</i>	20,94	12,95	213,05	1,62	9,27	4,79	34,95	1,94
<i>H. riojanus</i>	20,43	13,80	221,70	1,48	8,56	4,59	30,88	1,87
<i>H. andinus</i>	20,74	14,14	230,68	1,47	8,17	4,26	27,42	1,92

Para el Área de los Eritrocitos, se observa que *H. cordobae* es la especie que mayor área presenta, mientras que *H. pulchellus* muestra el menor valor de área, mientras que *H. riojanus* e *H. andinus* muestran valores intermedios entre estas dos.

Del análisis discriminante entre las especies realizado con Área de los Eritrocitos y el Área de los Núcleos se obtuvieron dos funciones altamente significativas; la primera con un Eigenvalue de 1,07 explica el 79,62% del total de la variación observada, mientras que la segunda función con un Eigenvalue de 0,27 explica el 20,38% del total de la variación observada (Tabla 56).

Tabla 56. Resumen estadístico del análisis discriminante basado en Área del eritrocito y el Área del Núcleo de las cuatro especies.

Función Discriminante	Eigenvalue	Porcentaje Relativo	Correlación Canónica	λ de Wilks	X^2	GL	P
1	1,07191	79,62	0,71927	0,378709	118,4605	6	0,0000
2	0,274451	20,38	0,46406	0,784651	29,5869	2	0,0000

La representación gráfica de las dos funciones discriminantes significativas, analizándola desde la Función 1 muestra una diferenciación clara entre *H. cordobae* y las demás especies; siendo que la variable que tiene peso en esta función es el Área del eritrocito (Figura 75).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

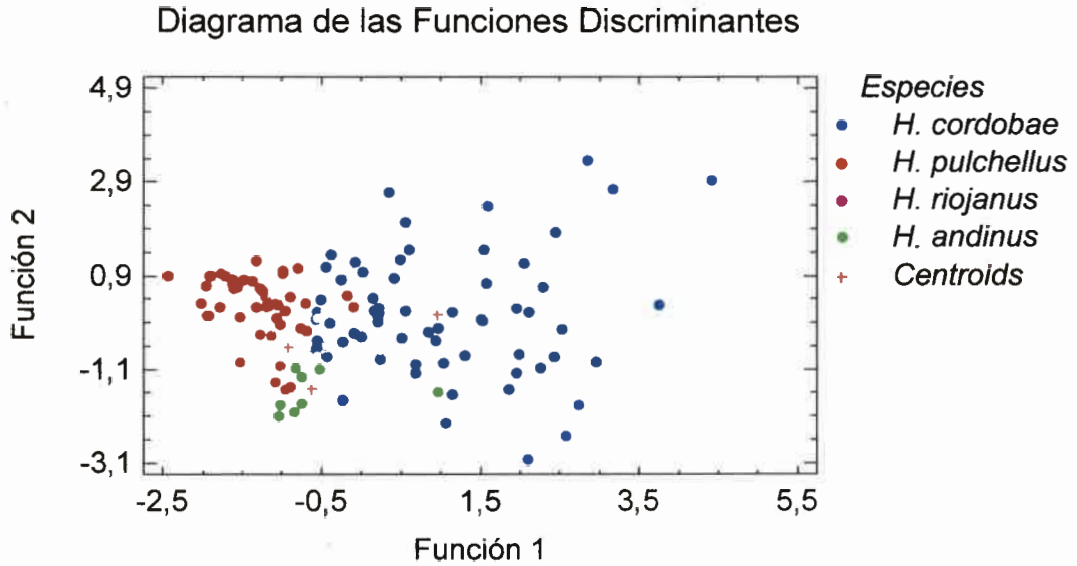


Figura 75. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre el Área de los Eritrocitos y el Área de los Núcleos de las cuatro especies estudiadas.

El porcentaje de casos correctamente clasificados fue de 74,60%, con valores altos de clasificación para cada especie (Tabla 57).

Tabla 57. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando el Área de los Eritrocitos y el Área de los Núcleos para las cuatro especies estudiadas: 1. *H. cordobae*; 2. *H. pulchellus*; 3. *H. riojanus*; 4. *H. andinus*.

Grupo Actual	n	Especie			
		1	2	3	4
1	66	46 (69,70%)	9 (13,64%)	7 (10,61%)	4 (6,06%)
2	40	1 (2,50%)	33 (82,50%)	5 (12,50%)	1 (2,50%)
3	10	1 (10,00%)	1 (10,00%)	7 (70,00%)	1 (10,00%)
4	10	0	0	2 (20,00%)	8 (80,00%)

Para evaluar si el Área de los Eritrocitos y el Área de los Núcleos presentan variación geográfica se realizaron regresiones simples entre cada variable y las latitudes de cada población para las cuatro especies en conjunto.

Solo el Área de los Núcleos mostro relación significativa con la latitud (Figura 76).

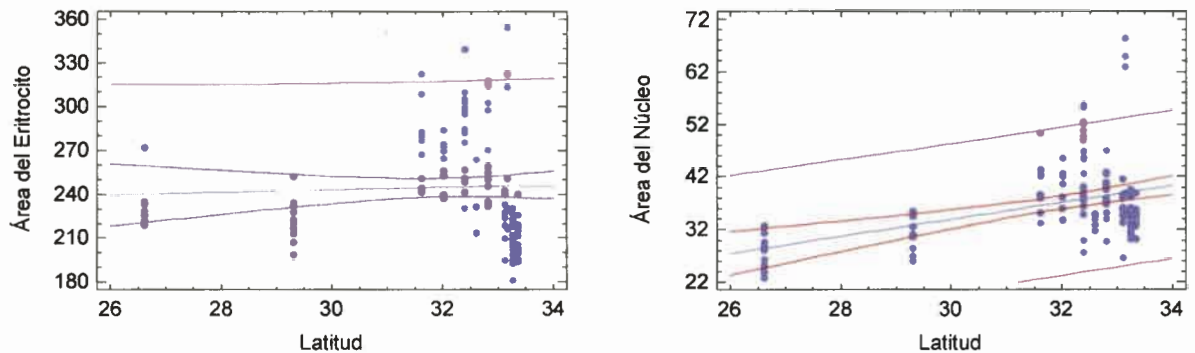


Figura 76. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda: $r=0,0446441$, $R^2=0,199\%$, $p=0,6196$) y Área del Núcleo (derecha: $r=0,397446$, $R^2=15,79\%$, $p=0,0000$) versus la altitud de cada población estudiada.

Luego se realizaron regresiones simples entre estas dos variables y la altitud de cada población; de la cual solo el Área de los Eritrocitos mostro relación significativa positiva con la altitud (Figura 77).

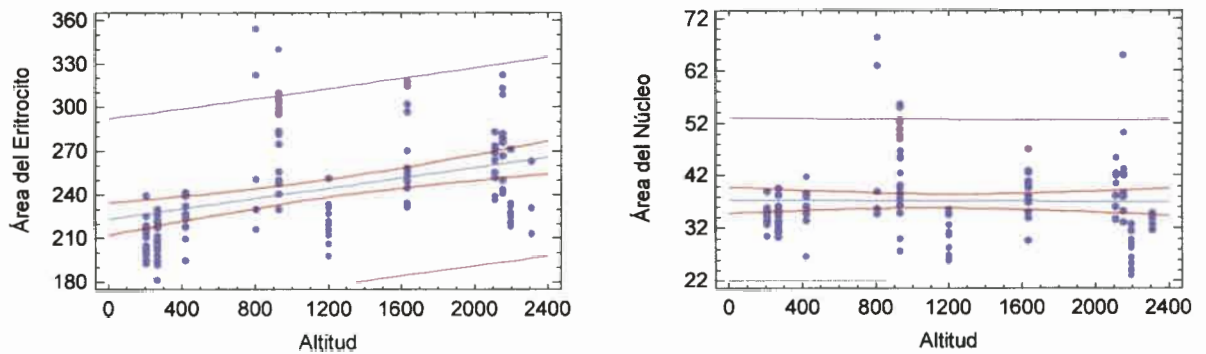


Figura 77. Regresiones lineales entre el Área del Eritrocito (izquierda: $r=0,368717$, $R^2=13,59\%$, $p=0,0080$) y Área del Núcleo (derecha: $r=-0,0158158$, $R^2=0,025\%$, $p=0,8605$) versus la altitud de cada población estudiada.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Se realizó una regresión simple entre el SVL y el Área de los Eritrocitos, mostrando una relación negativa significativa entre estas dos variables ($p=0,398$; $r=-0,253688$; $R^2=6,43\%$, $F=4,40$) (Figura 78).

Para el Área de los Núcleos, *H. crodobae* también presenta mayor área, seguido de *H. pulchellus*, luego *H. riojanus* y por último *H. andinus* presenta la menor área. La regresión simple entre el Área de los Núcleos y el SVL mostró que no hay relación significativa entre estas dos variables ($p=0,3071$; $F=1,06$).

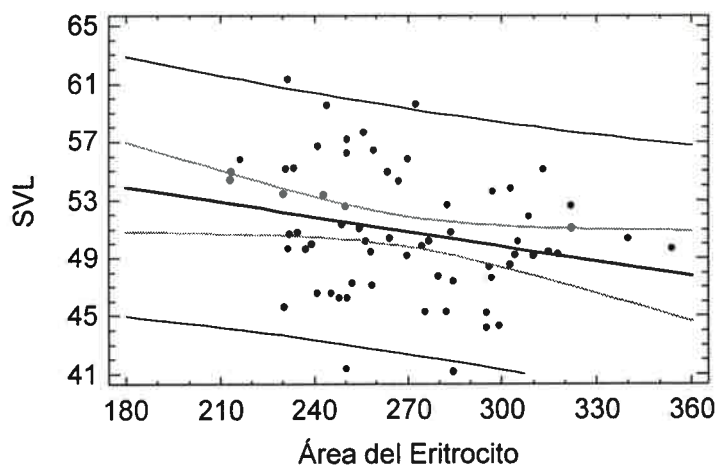


Figura 78. Regresión lineal entre el SVL y el Área del eritrocito en las cuatro especies estudiadas.

En cuanto a la forma, tanto los eritrocitos como sus núcleos en *H. pulchellus* es la especie que presentó forma más ovalada, mientras que las demás especies los valores de RE y RN son similares (Figura 79).

Sin embargo en las cuatro especies los eritrocitos presentaron una forma ovalada, con el núcleo también ovalado y centralmente localizado.

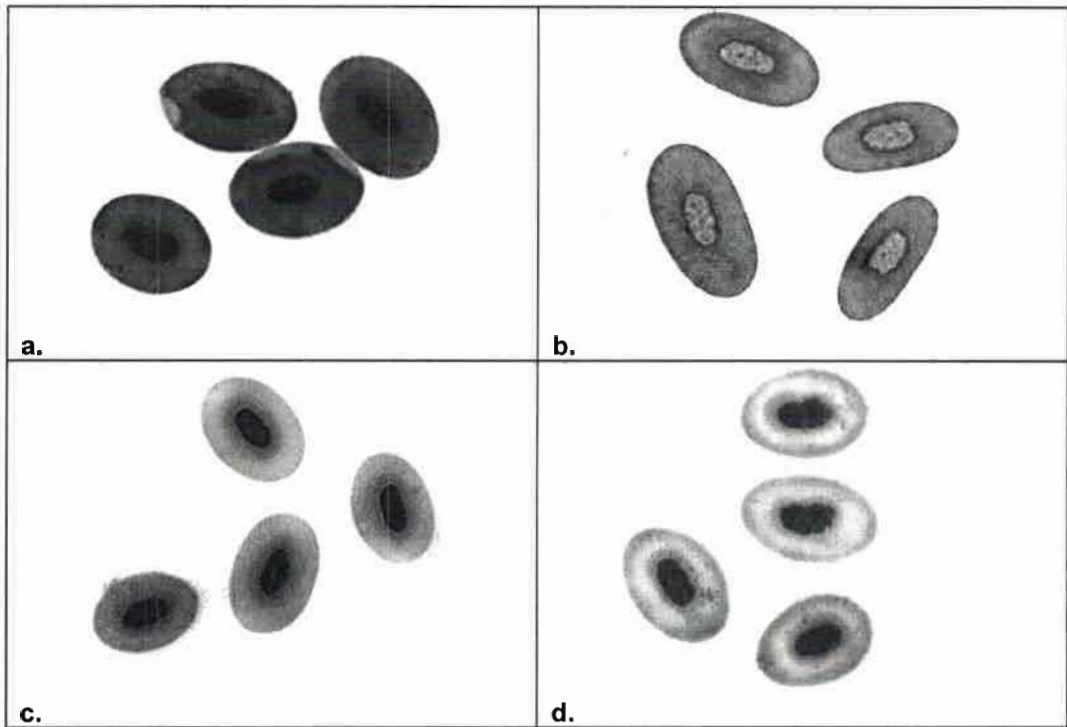


Figura 79. Forma de los eritrocitos y sus núcleos. a. *H. cordobae*; b. *H. pulchellus*; c. *H. riojanus*; d. *H. andinus*.

Al realizar una regresión simple entre el Área de los eritrocitos y el Área del Núcleo, la regresión mostró una relación altamente significativa entre las dos variables, con un coeficiente de regresión positivo ($p= 0,0000$; $r=0,649557$; $R^2=42,19\%$; $F=91,23$) (Figura 80).

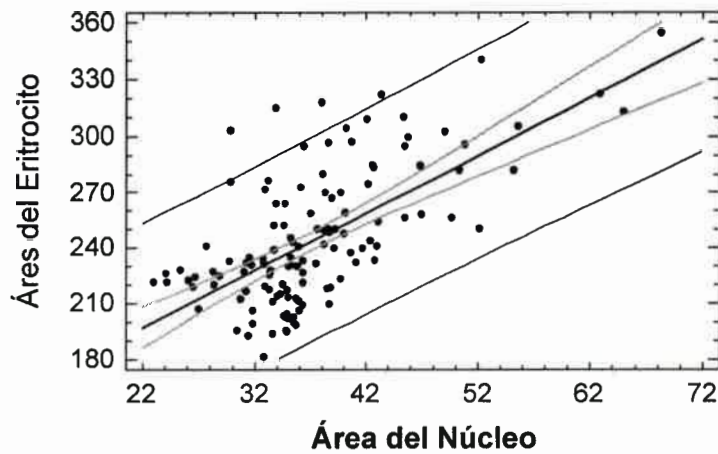


Figura 80. Regresión lineal entre el Área del Eritrocito y el Área del Núcleo.

CITOGENÉTICA

De las cuatro especies estudiadas se realizaron análisis citogenéticos a un total de 67 individuos. Se confeccionaron cariotipos de *H. pulchellus* e *H. cordobae*.

Para las dos especies, *H. cordobae* e *H. pulchellus*, se determinó un nivel de ploidía de $2n = 24$, con un número fundamental de $NF = 48$.

Para las medidas morfológicas se obtuvo un valor promedio por especie. Una clara distinción entre los cariotipos de ambas especies puede observarse considerando las diferencias en los largos relativos de los cromosomas (*Hrl*) y estas diferencias se observan en los cromosomas 1-4, siendo mayores para *H. cordobae* (Tabla 58).

Los doce pares cromosómicos se clasificaron en tres grupos para *H. cordobae*: el par cromosómico 1 grande, con un largo relativo del cromosoma de 16.20%; los segundos cinco cromosomas comprenden el grupo de cromosomas medianos, con un largo relativo entre 12.45% y 7.58%. Los seis cromosomas restantes forman el grupo de los cromosomas pequeños, con un largo relativo entre 6.57% y 4.04% (Fórmula cariológica 1:5:6) (Figura 81, Tabla 58).

Para *H. pulchellus*, los doce pares cromosómicos se clasificaron en dos grupos: los cromosomas del 1-6 grandes, con un largo relativo del cromosoma entre 12.26% y 8.79% y los seis cromosomas restantes (7-12) comprenden el grupo de cromosomas pequeños, con un largo relativo entre 8.03% y 3.90% (Fórmula cariológica 6:6) (Figura 81, Tabla 58).

La morfología cromosómica fue la misma para las dos especies: los pares 1 y 8-12 mostraron morfología metacéntricas, mientras que los pares 2-7 mostraron morfología submetacéntrica (Figura 81, Tabla 58).

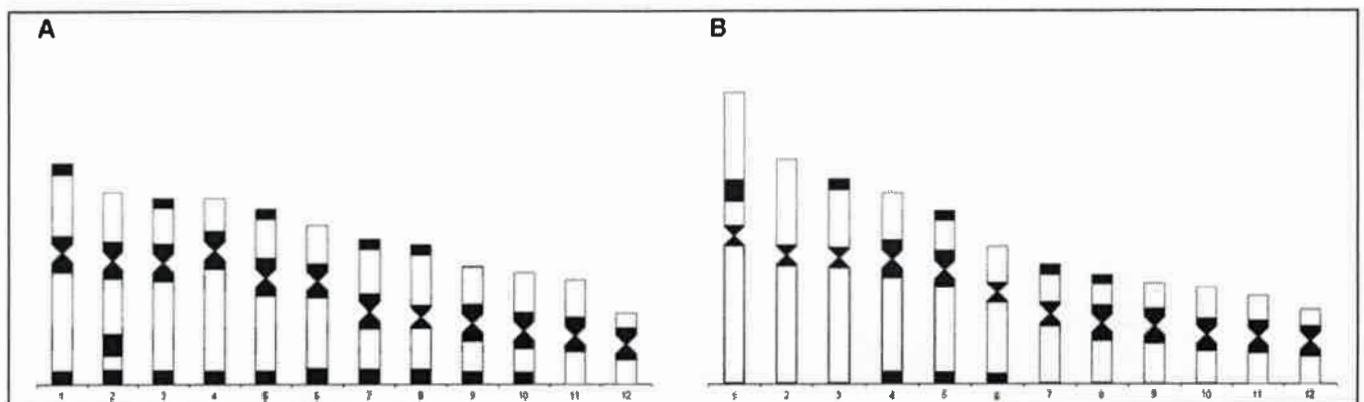


Figura 81. Ideogramas basados en los datos morfométricos de los cariotipos de la Tabla D. A – *H. pulchellus*; B – *H. cordobae*. Las áreas negras indican las Bandas-C.

Tabla 58. Parámetros del complemento cromosómico utilizados para la elaboración del ideograma de *H. cordobae* y *H. pulchellus* fórmula cariológica (1:5:6); NF=48.

P	<i>H. cordobae</i>				<i>H. pulchellus</i>			
	<i>Hrl</i>	<i>r</i>	<i>i</i>	T	<i>Hrl</i>	<i>r</i>	<i>i</i>	T
1	16,20	1,18	45,94	M	12,26	1,09	47,88	M
2	12,45	1,71	37,74	SM	10,63	1,52	39,72	SM
3	11,33	2,14	33,26	SM	10,30	1,55	39,33	SM
4	10,55	2,73	27,81	SM	10,30	2,89	25,89	SM
5	9,54	2,59	31,81	SM	9,65	2,03	33,06	SM
6	7,58	2,95	28,53	SM	8,79	2,78	24,45	SM
7	6,57	1,94	35,08	SM	8,03	1,94	34,46	SM
8	5,99	1,51	40,15	M	7,70	1,43	41,25	M
9	5,52	1,41	41,61	M	6,51	1,26	44,41	M
10	5,31	1,40	43,54	M	6,18	1,27	44,15	M
11	4,81	1,34	42,86	M	5,75	1,06	48,45	M
12	4,04	1,24	44,97	M	3,90	1,10	47,62	M

P: par; *Hrl*: longitud relativa del cromosoma; *r*: relación de brazos; *i*: índice centromérico; T: Tipo, M: metacéntrico, SM: submetacéntrico.

Para las dos especies el Bando-C mostró el mismo patrón de heterocromatina constitutiva en la región centromérica de todos los pares (Tabla 59).

En *H. cordobae* se reveló heterocromatina pericentromérica en los cromosomas de los pares 4, 5 y 8-12. El Bando-C se observó también en la región intersticial del brazo corto del par 1 y en la región telomérica del brazo largo de los pares 4-6 y 9 (Figura 81, Tabla 59).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Tabla 59. Distribución de heterocromatina centromérica, pericentromérica, intersticial o telomérica en *H. cordobae* y *H. pulchellus*.

<i>H. cordobae</i>					<i>H. pulchellus</i>				
P	C	PC	Ip	Tq	C	PC	Iq	Tp	Tq
1	+		+		+	+		+	+
2	+				+	+	+		+
3	+				+	+		+	+
4	+	+		+	+	+			+
5	+	+		+	+	+		+	+
6	+			+	+	+			+
7	+				+	+		+	+
8	+	+			+			+	+
9	+	+		+	+	+			+
10	+	+			+	+			+
11	+	+			+	+			
12	+	+			+	+			

P: par; C: banda en la región centromérica; PC: banda en la región pericentromérica; Ip: banda en la región intersticial del brazo corto; Iq: banda en la región intersticial del brazo largo; Tp: banda en la región telomérica del brazo corto; Tq: banda en la región telomérica del brazo largo.

En *H. pulchellus* se reveló heterocromatina pericentromérica en los cromosomas de todos los pares, excepto el par 8. El Bando-C se observó también en la región intersticial del brazo largo de los cromosomas del par 2. En la regiones teloméricas el Bando-C se observó en el brazo corto de los cromosomas de los pares 1, 3, 5, 7 and 8; y en el brazo largo de los cromosomas de los pares 1-10 (Figura 81, Tabla 59).

Para *H. riojanus* e *H. andinus* se determinó el nivel de ploidía de $2n = 2x = 24$ a partir del análisis de células meióticas (diacinesis y Meiosis II).

En cuanto a las figuras meióticas se observó que para *H. cordobae* e *H. pulchellus*, en algunos casos los doce pares de cromosomas bivalentes forman anillos, presentando dos quiasmas terminales; pero en la mayoría de las células el par de cromosomas 1 grande presenta solo un quiasma terminal, y el bivalente muestra una configuración abierta particular, no en forma de anillo, sino en forma de cadena.

Para *H. riojanus* e *H. andinus* en las figuras meióticas, los bivalentes también formaron anillos con dos quiasmas terminales, sin embargo no se encontró la formación de cadenas en estas especies.

BIOACÚSTICA

Los ejemplares de las cuatro especies en estudio se los ha observado cantando en la orilla de los cuerpos de agua (ríos o arroyos) o en el interior de lagunas para el caso de *H. pulchellus*. En *H. cordobae*, *H. riojanus* e *H. andinus* se observaron individuos cantando fuera del agua (sobre suelo, rocas o vegetación), y también dentro de los cuerpos de agua, semisumergidos, sujetos a vegetación acuática. A diferencia de éstas, para *H. pulchellus* los lugares de canto fueron siempre fuera del agua.

Los valores promedios reflejados para cada especie revelan que en cuanto a la duración del canto, *H. cordobae*, *H. riojanus* e *H. andinus* poseen valores similares, mientras que *H. pulchellus* presenta una duración del canto promedio menor. En cuanto a la duración de las notas, *H. pulchellus* e *H. cordobae* presentan valores semejantes (algo menor en *H. pulchellus*), y en la mayoría de los cantos la nota final es la de mayor duración. *H. riojanus* e *H. andinus* presentan valores semejantes entre sí, mayores a los de las de *H. pulchellus* e *H. cordobae*, y además, a diferencia de éstas últimas, en la mayoría de los cantos la primer nota es de mayor duración que las restantes. Respecto al intervalo entre cantos, los valores obtenidos muestran valores similares en *H. cordobae* e *H. riojanus*, mientras que para *H. pulchellus* se muestran valores mucho menores, similares a los de *H. andinus*, sin embargo para esta última especie solo se tomó valores de IC de un solo individuo. Esta diferencia también se observa en la TC, ya que para *H. pulchellus* la TC es mayor que para las demás especies, y con un rango mucho más amplio también. Para el caso de los valores de frecuencias, se observa lo mismo que para el caso de la duración de las notas: *H. pulchellus* e *H. cordobae* presentan valores semejantes (algo menor en *H. pulchellus*) y con un leve aumento de las primeras a las últimas notas; mientras que *H. riojanus* e *H. andinus* presentan valores semejantes entre sí, pero menores a los de *H. pulchellus* e *H. cordobae* (Tabla 60).

La variación más notable, en cuanto a bioacústica, entre las cuatro especies en estudio, es el número de notas por canto. *Hypsiboas cordobae* presentó cantos compuestos por dos, tres, cuatro y cinco notas, al igual que *H. riojanus*; mientras que *H. andinus* los cantos presentaron entre tres y siete notas. Para *H. cordobae* predominan los cantos de cuatro notas, mientras que para *H. riojanus* e *H. andinus* predominan los cantos de tres notas. *Hypsiboas pulchellus* es la que más se diferencia de las tres

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia *Hylidae*, *Anura*) en la región central de Argentina

especies anteriores, ya que presenta cantos compuestos de dos notas, y en una baja proporción (1,99%) cantos compuestos de una sola nota.

Tabla 60. Valores promedio de las variables acústicas analizadas para las cuatro especies estudiadas.

Variab les	<i>H. cordobae</i>	<i>H. pulchellus</i>	<i>H. riojanus</i>	<i>H. andinus</i>
DC	295,95	132,91	255,57	225,18
DN1	24,95	16,59	46,38	44,09
IN1	67,06	77,26	51,47	54,78
DN2	23,4	37,32	33,73	17,36
IN2	58,60		41,65	46,84
DN3	30,08		34,37	32,32
IN3	53,49		36,05	42,49
DN4	47,43		32,29	36,77
IN4	48,83		35,87	42,19
DN5	47,07		44,33	44,63
IN5				48,67
DN6				28,33
IN6				56
DN7				49
IC	1773,5	291,33	1411,93	447,33
FDC	1908,53	2331,99	1712,22	1731,38
FD1	1787,26	2212,89	1676,99	1715,78
FD2	1819,41	2345,24	1689,51	1697,11
FD3	1885,95		1670,55	1724,29
FD4	1929,47		1651,17	1632,75
FD5	1836,97		1527,31	1730,06
FD6				1521,33
FD7				1507
TC	30	95	44	36

Para el análisis estadístico de las variables acústicas, se han tomado cinco variables temporales (DC, DN1, DN2, IN1, TC) y tres variables espectrales (FDC, FD1, FD2), ya que son aquellas variables que comparten todos los individuos analizados de las cuatro especies en estudio.

De las ocho variables comparadas mediante ANOVA (*H. cordobae* $n = 59$; *H. pulchellus* $n = 40$; *H. riojanus* $n = 17$; *H. andinus* $n = 11$) todas mostraron diferencias significativas, con $p = 0,0000$ (Tabla 61).

Tabla 61. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar las variables acústicas de las cuatro especies en estudio.

Variable	p	F
DC	0,0000	106,36
DN1	0,0000	35,04
DN2	0,0000	34,65
IN1	0,0000	12,28
TC	0,0000	41,61
FDC	0,0000	44,25
FD1	0,0000	41,14
FD2	0,0000	68,48

Del test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las especies entre sí, se obtuvieron los siguientes resultados: la DC, DN1 y FDC, muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre *H. riojanus* e *H. andinus*, pero si existe diferencias significativas entre estas dos y *H. cordobae* e *H. pulchellus*, y también muestran diferencias significativas entre *H. cordobae* e *H. pulchellus*, tal como fue explicado anteriormente en base a los datos de la Tabla 60. La TC y la FD1 muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre *H. cordobae*, *H. riojanus* e *H. andinus*; pero si existe diferencias significativas entre estas tres especies e *H. pulchellus*. Para el caso de IN1 y la FD2, muestran que *H. pulchellus* se diferencia significativamente de las otras tres especies, no presentando diferencias significativas *H. cordobae*-*H. andinus* e *H. andinus*-*H. riojanus*. Para el caso particular de la DN2, no se mostró diferencias significativas entre *H. pulchellus* e *H. riojanus*, pero si se diferenciaron significativamente *H. cordobae* e *H. andinus* (Tabla 62).

Tabla 62. Resultado del test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las cuatro especies.

ESPECIE	VARIABLES							
	DC	DN1	IN1	DN2	FDC	FDN1	FDN2	TC
<i>H. pulchellus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>H. cordobae</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>H. riojanus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>H. andinus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Las regresiones simples, mostraron que la DC, IN1 y la TC varían en función de la temperatura, y fueron ajustadas a 16°C (DC: $r = -0,488494$, $R^2 = 23,86\%$, $p = 0,000$; IN1: $r = -0,392676$, $R^2 = 15,41\%$, $p = 0,0000$; TC: $r = 0,409673$, $R^2 = 16,78\%$, $p = 0,0000$); mientras que la DN1, DN2, FDC, FD1 Y FD2 no varían en función de la temperatura (DN1: $r = 0,0619026$, $R^2 = 0,38\%$, $p = 0,48761$; DN2: $r = 0,157901$, $R^2 = 2,49\%$, $p = 0,0751$; FDC: $r = 0,0258724$, $R^2 = 0,066\%$, $p = 0,7728$; FD1: $r = 0,0291997$, $R^2 = 0,085\%$, $p = 0,7435$; FD2: $r = 0,0799306$, $R^2 = 0,63\%$, $p = 0,3698$).

Del análisis discriminante se obtuvieron tres funciones altamente significativa ($p = 0,0000$); la primera, con un Eigenvalue de 9.77 explica el 91.68% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,95249; λ de Wilks = 0,0445638).

En el gráfico de las Funciones Discriminantes 1 y 2 (Figura 82) se observa como *H. pulchellus* se diferencia bien de las otras tres especies. *H. cordobae*, también se ve diferenciada, aunque se observa que *H. riojanus* e *H. andinus* entre sí y también con *H. cordobae*. Esta diferencia se ve reflejada en el Factor 1, el cual está compuesto principalmente por la DC y la DN2.

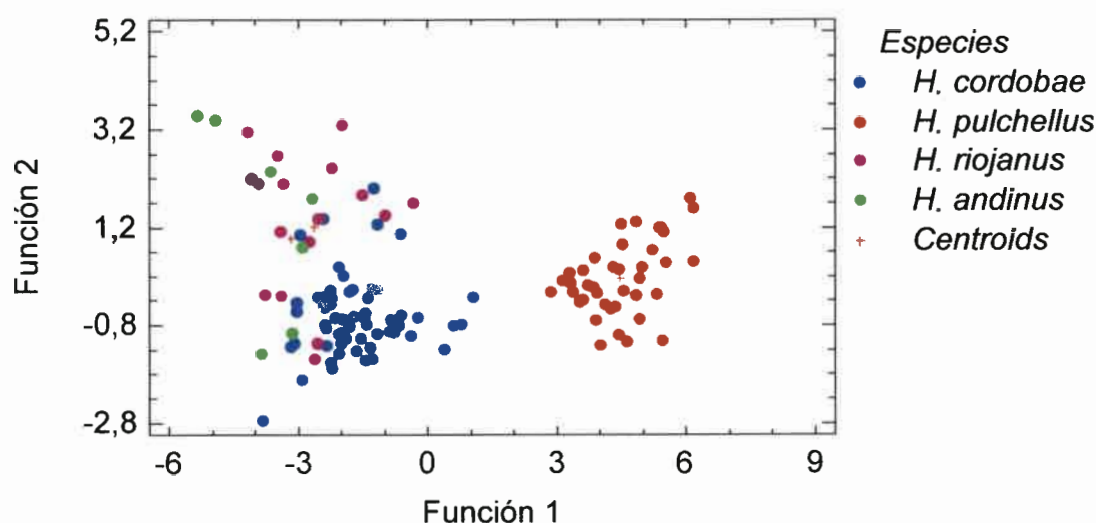


Figura 82. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables acústicas compartidas por las cuatro especies de *Hypsiboas* en estudio.

A continuación se presenta la tabla de clasificación (Tabla 63) en la cual se muestra que el porcentaje de individuos correctamente clasificados fue de 88,19%.

Tabla 63. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables acústicas para las cuatro especies estudiadas: 1. *H. cordobae*; 2. *H. pulchellus*; 3. *H. riojanus*; 4. *H. andinus*.

Grupo Actual	n	Especies			
		1	2	3	4
1	59	55 (93,22%)	0	4 (6,78%)	0
2	40	0	40 (100%)	0	0
3	17	4 (23,53%)	0	11 (64,71%)	2 (11,76%)
4	11	5 (45,45%)	0	0	6 (54,55%)

Para cada especie, los porcentajes de individuos correctamente clasificados fueron altos; *H. pulchellus* mostró un 100% de individuos correctamente clasificados, lo que demuestra, junto a lo expuesto anteriormente, que esta especie es la que más se diferencia de las tres restantes; *H. cordobae* también presenta un alto porcentaje de individuos correctamente clasificados 93,22%, y el resto se clasificó erróneamente como *H. riojanus*; para *H. riojanus* un 64,61% de individuos fueron correctamente clasificados, el resto, en su mayoría se clasificaron erróneamente como *H. cordobae*, y en menor proporción como *H. andinus*; mientras que para *H. andinus* el 54,55% fueron correctamente clasificados, y el resto fue erróneamente clasificado como *H. pulchellus*.

Para evaluar si las variables acústicas presentan variación geográfica se realizaron regresiones simples entre cada variable acústica y las latitudes de cada población para las cuatro especies en conjunto.

A excepción de la DN3, DN5, IC e IN4, las demás variables mostraron relación significativa con la latitud, dentro de las que en su mayoría el coeficiente de correlación fue positivo, a excepción de la DC y DN1 (Tabla 64, Figura 83).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

Tabla 64. Análisis de correlación entre cada variable acústica y la latitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies. El asterisco indica la variable cuya relación con la latitud no resultó significativa. A: variables ajustadas a la temperatura. R² muestra el porcentaje de la variación explicada.

Variable	<i>r</i>	R ²	<i>p</i>
A DC	-0,361696	13,08	0,0000
DN1	-0,634009	40,19	0,0000
A IN1	0,278489	7,75	0,0015
DN2	0,246453	6,07	0,0050
IN2	0,428954	18,40	0,0000
DN3	-0,137228	1,88	0,2023*
IN3	0,432761	18,72	0,0000
DN4	0,352101	12,39	0,0018
IN4	0,3799	14,43	0,0671*
DN5	0,059019	0,34	0,7746*
IC	-0,0255096	0,06	0,8742*
FDC	0,517666	26,79	0,0000
FD1	0,428237	18,33	0,0000
FD2	0,49752	24,75	0,0000
FD3	0,321113	10,31	0,0023
FD4	0,398782	15,90	0,0004
FD5	0,444691	19,77	0,0177
A TC	0,417303	17,41	0,0000

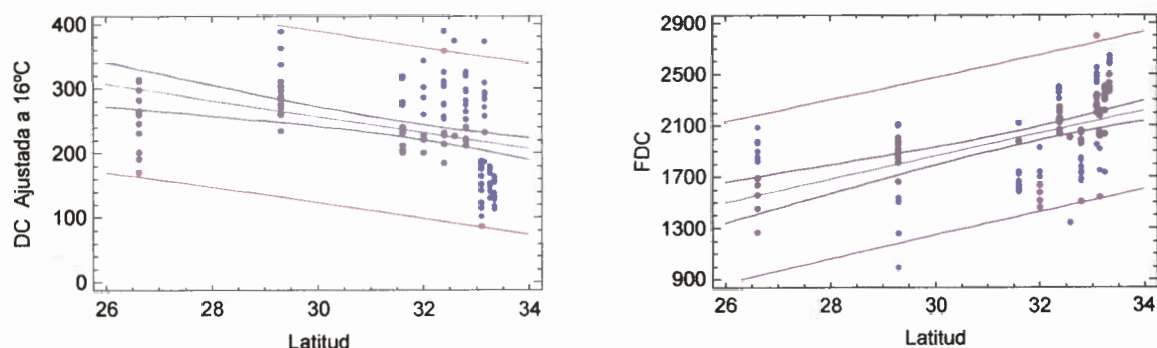


Figura 83. Regresiones lineales entre la Duración del Canto ajustada a 16°C (izquierda), Frecuencia Dominante (derecha) y la latitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.

Luego se realizaron regresiones simples entre cada variable acústica y la altitud de cada población. De las variables temporales, la DC, DN1, IN1, IC, DN2 y TC mostraron relación significativa con la altitud. En cuanto a las variables espectrales

todas, excepto la FD5, mostraron relación significativa con la altitud, y en todos los casos el coeficiente de correlación fue negativa (Tabla 65, Figura 84).

Tabla 65. Análisis de correlación entre cada variable acústica y la altitud de las poblaciones estudiadas, para las cuatro especies. El asterisco indica la variable cuya relación con la latitud no resultó significativa. A: variables ajustadas a la temperatura. R^2 muestra el porcentaje de la variación explicada.

Variable	r	R^2	p
A DC	0,555003	30,80	0,0000
DN1	0,425159	18,07	0,0000
A IN1	-0,498618	24,86	0,0000
DN2	-0,508439	25,85	0,0050
IN2	-0,146498	2,14	0,1732*
DN3	-0,00254797	0,0006	0,9813*
IN3	-0,111378	1,24	0,3391*
DN4	0,107672	1,15	0,3545*
IN4	0,377246	14,23	0,0692*
DN5	0,1350	1,82	0,5108*
IC	0,317486	10,07	0,0431
FDC	-0,759725	57,71	0,0000
FD1	-0,695191	48,32	0,0000
FD2	-0,766568	58,76	0,0000
FD3	-0,48435	23,45	0,0000
FD4	-0,534118	28,52	0,0000
FD5	-0,31266	9,77	0,1052*
A TC	-0,519407	26,97	0,0000

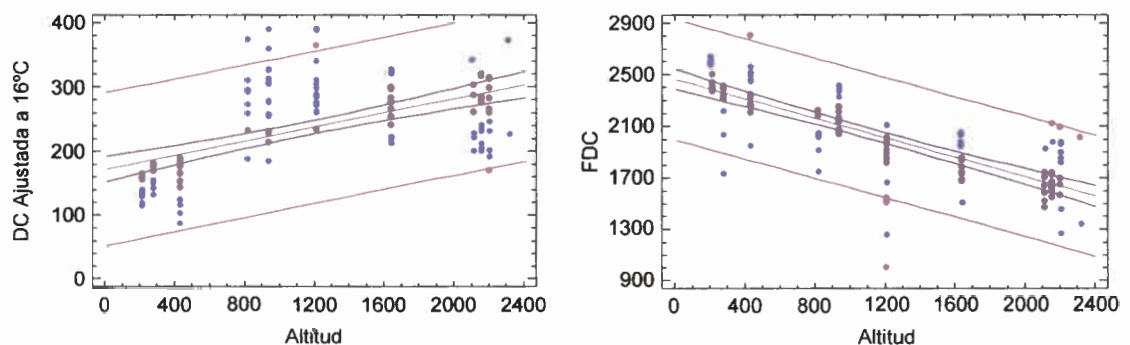


Figura 84. Regresiones lineales entre la Duración del Canto ajustada a 16°C (izquierda), Frecuencia Dominante (derecha) y la altitud de las poblaciones estudiadas para las cuatro especies.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

El análisis de agrupamiento realizado a partir de la matriz de distancias cuadradas de Mahalanobis mostró las relaciones acústicas entre las cuatro especies estudiadas. *H. cordobae* e *H. riojanus* conforman un grupo distante de *H. andinus*, mientras que *H. pulchellus* constituye la especie acústicamente más alejada de las otras tres especies estudiadas (Figura 85).

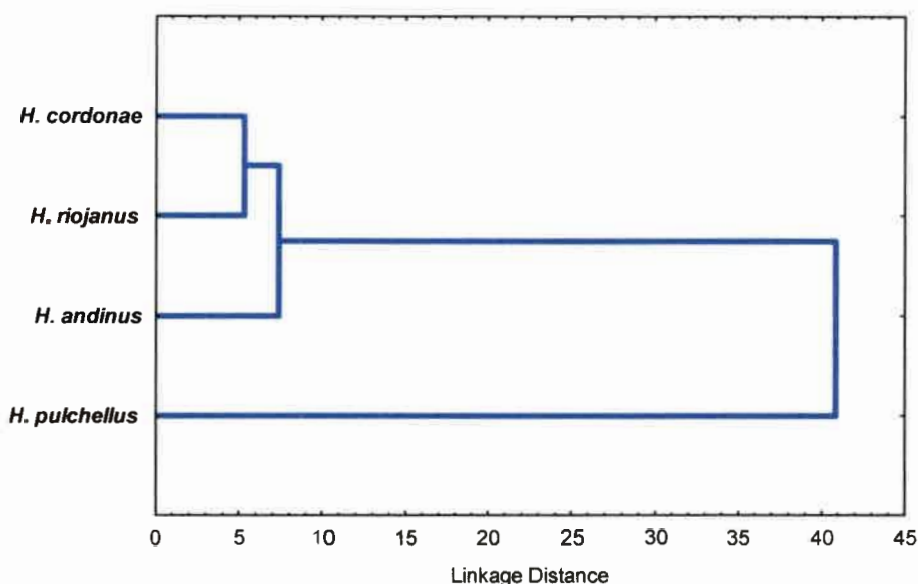


Figura 85. Dendrograma (método UPGMA) de las relaciones acústicas entre las cuatro especies estudiadas basados en las distancias de Mahalanobis.

De todos estos resultados obtenidos de la comparación acústica de las cuatro especies en estudio se observa que *H. pulchellus* es la quien más se diferencia en canto de las otras tres especies estudiadas. Por ello, se realizó a continuación un análisis discriminante con tres de las especies: *H. cordobae*, *H. riojanus* e *H. andinus*. En este análisis también se utilizaron para el análisis estadístico las variables acústicas compartidas por las tres especies: DC, DN1, DN2, DN3, IN1, IN2, TC, FDC, FD1, FD2 y FD3.

De las once variables comparadas mediante ANOVA todas mostraron diferencias significativas, excepto la DN3, la FD1 y la FD2 (Tabla 66) (*H. cordobae* $n = 59$; *H. riojanus* $n = 17$; *H. andinus* $n = 11$).

Tabla 66. Valores de p y F del ANOVA realizado para comparar las variables acústica de *H. cordobae*, *H. riojanus* y *H. andinus*. El asterisco indica las variables que no mostraron diferencias significativas.

Variable	p	F
DC	0,0000	12,62
DN1	0,0000	20,71
DN2	0,0000	14,77
DN3	0,3105*	1,19
IN1	0,0002	9,72
IN2	0,0000	15,34
TC	0,0044	5,79
FDC	0,01	4,50
FD1	0,2006*	1,64
FD2	0,0884*	2,50
FD3	0,0055	5,54

Del test a posteriori LSD (Fisher's least) para comparar las especies entre sí, se obtuvieron los siguientes resultados: la DC, DN1, DN2, IN1 e IN2 muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre *H. riojanus* e *H. andinus*, pero si existe diferencias significativas entre estas dos e *H. cordobae*. Mientras que para la FDC, FD3 y TC no hay diferencias significativas entre *H. riojanus* e *H. andinus*, ni entre *H. cordobae* e *H. andinus*, pero existe diferencias significativas entre *H. riojanus* e *H. cordobae*.

Las regresiones simples, mostraron que todas las variables varían en función de la temperatura (las cuales fueron ajustadas a 16°C), excepto la DN2 y la DN3: DC: $r = -0,492958$, $R^2 = 24,30\%$, $p = 0,0000$; IN1: $r = -0,449919$, $R^2 = 20,24\%$, $p = 0,0000$; IN2: $r = -0,483896$, $R^2 = 23,41\%$, $p = 0,0000$; TC: $r = 0,360242$, $R^2 = 12,97\%$, $p = 0,0006$; DN1: $r = 0,236116$, $R^2 = 5,57\%$, $p = 0,0268$; DN2: $r = -0,0180742$, $R^2 = 0,03\%$, $p = 0,8673$; DN3: $r = -0,178893$, $R^2 = 3,20\%$, $p = 0,0954$; FDC: $r = -0,305103$, $R^2 = 9,30\%$, $p = 0,0041$; FD1: $r = 0,275368$, $R^2 = 7,58\%$, $p = 0,0094$; FD2: $r = -0,249665$, $R^2 = 6,23\%$, $p = 0,019$; FD3: $r = 0,0016$, $R^2 = 11,04\%$, $p = 0,0016$.

Del análisis discriminante se obtuvieron dos funciones altamente significativa ($p = 0,0000$; $p = 0,0210$); la primera, con un Eigenvalue de 0,62 explica el 67,06% del total de la variación observada (Corr. Can. = 0,61882; λ de Wilks = 0,48332).

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

El porcentaje de individuos correctamente clasificados fue de 77,01%. En la tabla de clasificación (Tabla 67) se observa que, para *H. cordobae* el porcentaje de individuos correctamente clasificados fue alto, y en menor medida también lo fue para *H. andinus*, mientras que para *H. riojanus* este porcentaje no supera el 50%. Las tres especies se diferencian entre sí, la función 1 diferencia principalmente a *H. andinus* de *H. cordobae* e *H. riojanus*, y la segunda función diferencia principalmente a *H. cordobae* de *H. andinus* e *H. riojanus* (Figura 86).

Hypsiboas cordobae se diferencia de las otras dos especies, mientras que *H. riojanus* e *H. andinus* se entremezclan entre sí y con *H. cordobae* (Figura 86).

Tabla 67. Clasificación en base a las funciones obtenidas a partir del análisis discriminante usando variables acústicas para las cuatro especies estudiadas: 1. *H. cordobae*; 3. *H. riojanus*; 4. *H. andinus*.

Grupo Actual	n	Especies		
		1	3	4
1	59	51 (86,44%)	7 (11,86%)	1 (1,69%)
3	17	6 (35,29%)	8 (47,06%)	3 (17,65%)
4	11	3 (27,27%)	0	8 (72,73%)

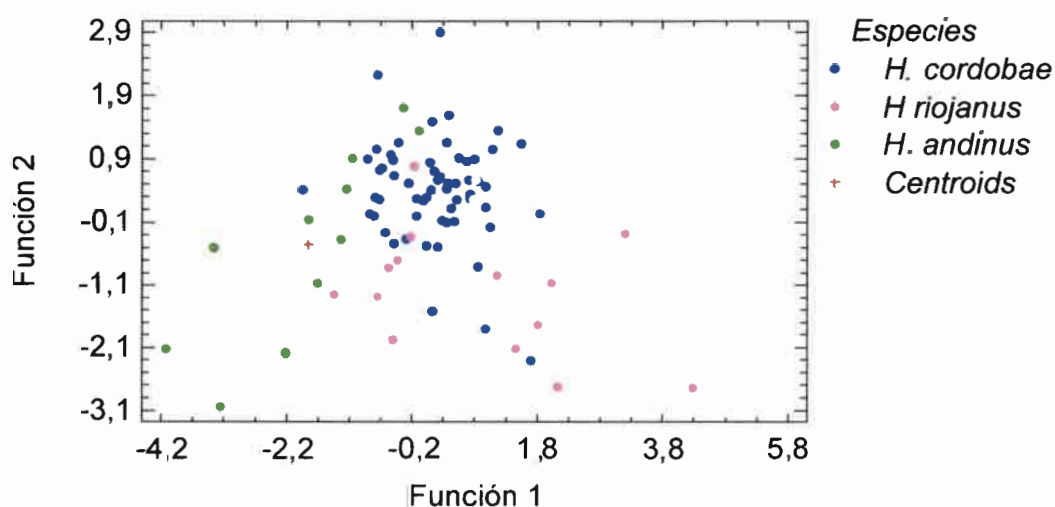


Figura 86. Función 1 y Función 2 del Análisis Discriminante realizado sobre las variables acústicas compartidas por tres de las especies en estudio.

DISCUSIÓN

Morfometría

Las características morfológicas externas descritas por diversos autores coinciden de manera general con lo observado en los especímenes capturados a lo largo de este trabajo.

Las cuatro especies mostraron una coloración del dorso variada, con o sin manchas, en coincidencia con lo descrito por Barrio (1965), Cei (1980) y Gallardo (1987); sin embargo estos autores no hacen referencia a la coloración de las manchas.

Comparativamente, *H. pulchellus* presento en su mayoría una coloración amarronada (clara u oscura), mientras que las otras tres especies mostraron con mayor frecuencia una coloración verde claro. Otra diferencia se observó en la forma del manchado, que para el caso de *H. cordobae* se ve como un retículo y las mismas no se unen entre sí, observándose también manchas pequeñas que simulan un punteado, y manchas de mayor tamaño. Para *H. pulchellus* aunque las manchas también muestren una forma de retículo, las mismas son de mayor tamaño, uniéndose en parte unas con otras, y no se observa en esta especie manchas pequeñas. *Hypsiboas riojanus* e *H. andinus*, presentaron un manchado intermedio, es decir, la forma no es reticulada, sino manchas más “redondeadas”, no unidas entre sí, y sin manchas más pequeñas. Además estas dos especies mostraron una coloración particular en la parte interna de los muslos, que no se observa en *H. pulchellus* e *H. cordobae*. Entre *H. riojanus* e *H. andinus* la única diferencia observada es la banda color crema a cada lado del cuerpo en *H. andinus*.

Si bien se observaron diferencias de coloración entre las especies, debido a la gran variabilidad y a la capacidad que ellas presentan de cambiar su coloración en relación al medio en el que se encuentren, este carácter no es bueno para distinguir las.

El tamaño de las cuatro especies estudiadas (SVL) presentó un rango de 31-61mm, coincidiendo con los valores que exponen varios autores para las cuatro especies estudiadas.

Hypsiboas cordobae presenta valores de SVL superiores al valor promedio citado por Barrio (1965) de 46,4mm; siendo también el rango que este autor presenta (39-50mm) menor a los encontrados en este trabajo. El ancho de la cabeza es similar al

largo de la misma, presentando un índice promedio de 0,93; aunque para Barrio (1965) este índice es algo mayor, de 1,08, por lo que indica que el ancho de la cabeza es algo mayor que su longitud.

Para *H. pulchellus*, Cei (1980), Barrio (1962, 1965) y Garcia *et al.* (2003) muestran valores similares en cuanto al rango del SVL: 37-51 mm, 40-55 mm, 37-49 mm, 33-45 mm respectivamente. Los valores se asemejan con los obtenidos en este trabajo, aunque el rango mínimo es menor. Además coincide el valor promedio de 43,39mm, con el valor presentado por Barrio (1965) de 44.8mm. El ancho de la cabeza es algo similar a su longitud, aunque levemente menor, con un índice promedio de 0,85, tal como fuera destacado por Barrio (1965) presentando para la especie un índice promedio de 0,99.

En *H. riojanus* el valor promedio y el rango coinciden con lo presentado por Barrio (1965) (52,8 mm, 48-56mm); aunque el rango de los datos mostrados en este trabajo es algo superior. El ancho de la cabeza resultó similar al largo de la misma (0.93), mientras que para este autor, el ancho de la cabeza es superior a la longitud (1,104).

A continuación se muestra una tabla comparativa con los valores de los resultados de este trabajo para *H. andinus* y los resultados obtenidos por diferentes autores para la especie (Tabla 68).

Respecto al valor promedio y rango de SVL de este trabajo, resultaron similares a los presentados por diversos autores (Barrio, 1965; Cei, 1980).

Para esta especie el ancho de la cabeza resultó algo menor al largo de la misma, con un índice promedio de 0,91; mientras que para Barrio (1965) esta relación es inversa, con un índice promedio de 1,102; y para Langone & Lavilla (2002) el ancho de la cabeza es aproximadamente igual al largo (índice cefálico de 1,01), al igual que para Duellman *et al.* (1997).

Respecto a las demás variables comparadas, los valores obtenidos en este trabajo son mayores a los citados por los distintos autores para *H. andinus*. Comparando los resultados con lo mostrado por Duellman *et al.* (1997) son algo mayores a los presentados por este autor, sobre todo en el Largo de la Pata, en donde tanto el valor promedio como el rango es considerablemente mayor en este trabajo. Lo mismo sucede

para las variables presentadas por Langone & Lavilla (2002), excepto el diámetro del ojo que resulto menor en este trabajo.

Tabla 68. Datos comparativos de las variable morfométricas de este trabajo con los datos obtenidos por otras fuentes de diferentes poblaciones de *H. andinus*.

	Barrio (1965)	Cei (1980)	Duellman et al. (1997)	Langone & Lavilla (2002)	Este trabajo
SVL	53,2 (47-60)	53 (alcanza los 60)	57,6 ♂ 62,7 ♀	51,1	52,58 ♂ (48,58-55,71)
HW			15 ± 1,82 (11,1-19,5)	16,8	15,68 ± 0,83 (14,25 -16,72)
LC			15,2 ± 1,44 (11,6-18,9)	16,6	17,50 ± 0,84 (15,48-18,32)
IO			4,4 ± 0,45 (3,5-5,6)		5,59 ± 0,55 (4,63-6,28)
DO			4,3 ± 0,50 (3,1-5,6)	5,77	5,59 ± 0,40 (4,97-6,07)
LB				25,56	26,63 ± 1,87 (22,84-28,86)
LF				26,1	28,29 ± 1,39 (26,22-30,92)
LT			24,5 ± 2,95 (17,3-32,2)	25	28,04 ± 1,76 (25,69-31,27)
LP			21,7± 2,90 (13,3-29,5)	35,9	39,88 ± 2,50 (36,39-43,50)

Para *H. cordobae*, se encontraron diferencias significativas en la morfometría entre machos y hembras. En Anuros, el dimorfismo sexual es un aspecto común de su morfología (Zug *et al.*, 2001), y las diferencias externas entre individuos machos y hembras incluyen el desarrollo glandular, textura u ornamentaciones de la piel, sacos vocales y coloración (Duellman & Trueb, 1994; Whitaker, 2001; Vitt & Caldwell, 2009), y en muchos clados las variaciones interespecíficas en el dimorfismo sexual se correlacionan con el tamaño corporal (Fairbairn, 1997).

Además, es conocido que en anuros existe un dimorfismo sexual marcado en el cual los machos son de menor tamaño que las hembras (Shine, 1979; Duellman & Trueb, 1994; Bosch & Marquez, 1996; Katsikaros & Shine, 1997; Dandova *et al.*, 1998, Muniz *et al.*, 2008).

Real & Antunez (1991), plantean algunas hipótesis referidas al menor tamaño de los machos. La presión de selección ejercida por los predadores sobre las poblaciones de anuros es un factor que puede dificultar a los machos alcanzar tamaños grandes (Duellman & Trueb, 1994). Otro factor que puede contribuir a limitar el tamaño del

cuerpo de los anuros machos es la demanda de energía asociada con la reproducción. El gasto de energía por parte de los machos, especialmente debido a las vocalizaciones, podría suponer una dificultad para alcanzar tamaños grandes (Real & Antunez, 1991). Esto afectaría especialmente a especies con períodos de reproducción largos (Wells, 1977) como es el caso de las especies estudiadas. Shine (1979) por su parte, intenta darle explicación al porqué las hembras usualmente muestran un tamaño corporal mayor al de los machos, proponiendo dos factores como responsables: por un lado, explica que la fecundidad de las hembras aumenta con el tamaño corporal más rápidamente que el éxito reproductivo del macho, por lo cual la selección actuaría sobre el tamaño corporal de las hembras, no en el de los machos; o bien, los machos sufren mayor mortalidad que las hembras, por lo cual raramente viven el tiempo suficiente para alcanzar un mayor tamaño corporal.

Respecto a los análisis comparativos de los valores morfométricos para las cuatro especies, los mismos mostraron que *H. pulchellus* se diferencia de las demás especies por ser de menor tamaño. *Hypsiboas cordobae* presenta valores intermedios entre *H. pulchellus* y las otras dos especies. Mientras que para *H. riojanus* e *H. andinus* los valores mostraron que son similares entre sí, y mayores a *H. cordobae* e *H. pulchellus*. Estos resultados coinciden con Barrio (1965), que aclara en su trabajo referido a las subespecies de *Hyla pulchella*, que *H. pulchellus* es una de las especies de menor tamaño, mientras que *H. riojanus* e *H. andinus* son muy similares entre sí, más robustas y de mayor tamaño que *H. cordobae* e *H. pulchellus*, tal como se demuestra en los resultados de este trabajo. Cei (1980), a diferencia de Barrio (1965), señala que *H. cordobae* presenta el mismo tamaño que *H. pulchellus*. Esto concuerda con el análisis de cluster UPGMA (Figura 85), que muestra a *H. pulchellus* e *H. cordobae* como grupos cercanos entre sí, y distantes de *H. riojanus* e *H. andinus*.

La diferenciación morfométrica entre las cuatro especies, indicadas mediante ANOVA y el análisis de cluster UPGMA siguieron una fuerte estructura geográfica.

Al analizar estos datos teniendo en cuenta la latitud, los datos mostraron que 14 de las 15 variables analizadas presentan relación significativa negativa con la latitud, es decir que hay una disminución del tamaño corporal en función de la latitud, una variación clinal de norte a sur de disminución del SVL.

Además, en este trabajo se observó un incremento en el tamaño corporal en función de la altitud, es decir mayor tamaño corporal a mayor nivel altitudinal. Estos resultados se presentaron tanto en el análisis realizado comparativamente entre las seis poblaciones de *H. cordobae*, como en el análisis comparativo de las cuatro especie.

Esta relación de los datos morfométricos y los niveles latitudinales y altitudinales concuerdan con lo que muestran también los demás análisis realizados (ANOVA y LSD) y reafirman lo expresado anteriormente. *H. pulchellus*, cuyas localidades de muestreo se encuentran más al sur y son las de menor nivel altitudinal, muestran SVL menores. *H. riojanus* e *H. andinus*, mostraron valores de SVL mayores, y sus localidades de muestreo son las que se encuentran más al norte y los niveles altitudinales son mayores a los de las localidades de *H. pulchellus*. Para *H. cordobae*, se mostraron valores de SVL intermedios, coincidiendo con los niveles latitudinales, ya que las localidades de muestreo se encuentran a latitudes intermedias entre las localidades de *H. pulchellus* y las localidades de *H. riojanus* e *H. andinus*. Sin embargo, los niveles altitudinales de las localidades de muestreo de *H. cordobae* muestran un amplio rango (808-2310), y al analizar la variación del SVL y la altitud de las seis poblaciones estudiadas para esta especie, también se encontró relación significativa positiva, por lo cual, que el SVL de *H. cordobae* presente valores intermedio podría ser resultado del amplio rango altitudinal entre las poblaciones de muestreo.

El tamaño del cuerpo es un rasgo morfológico fundamental, importante en un contexto fisiológico, ecológico y social. La variación geográfica en las estructuras morfológicas, particularmente el tamaño corporal, es común en muchas especies (Schäuble, 2004). Entre los anuros, los análisis de variación geográfica intraespecífica en morfología han revelado una amplia variación en el tamaño del cuerpo (Castellano *et al.*, 2000; Schäuble, 2004).

Las diferencias fenotípicas intraespecíficas entre poblaciones separadas geográficamente es común, y si bien el determinante de esta diferenciación es aún discutido, puede ocurrir como respuesta directa a la heterogeneidad del medio ambiente (Laugen *et al.*, 2002). Las variaciones morfológicas en el tamaño corporal de poblaciones de anfibios anuros puede deberse a diferencias ambientales, es decir, diferentes microhábitats puede favorecer diferentes tipos morfológicos (Narins & Smith, 1986).

Debido a que los anfibios son animales ectotermos, la mayoría de sus aspectos fisiológicos y comportamentales están afectados por la temperatura (Wells, 2007); por lo cual, esta relación entre el tamaño corporal y los niveles altitudinales de las localidades de muestreo pueden ser explicadas por las diferencias climáticas que las localidades presentan. Bickford *et al.* (2007) indican que condiciones ambientales extremas podrían imponer que la selección se establezca sobre la morfología, reduciendo o eliminando cambios morfológicos que pueden acompañar a la especiación. Mientras que Gould & Johnston (1972), al referirse a la relación entre variables morfológicas y ambientales, indican que si la variación intraespecífica se debe a la selección natural, se debe esperar una fuerte asociación entre la morfología y los factores ambientales que influyen en la adaptación; siendo esta correlación la principal prueba de selección en la variación geográfica.

Castellano & Giacoma (2000) exponen ejemplos en los cuales se explica la variación en el tamaño corporal como una diferenciación debida a cuestiones climáticas, argumentando que en regiones desérticas los individuos son mayores que aquellos que habitan zonas más húmedas, y explican estas diferencias como el efecto de la selección natural contra la desecación (Nevo, 1972; Nevo & Capranica, 1985). Esto podría explicar que en regiones como las localidades de muestreo de *H. riojanus* e *H. andinus*, que presentan un clima seco los individuos muestren mayor tamaño que en las localidades de *H. cordobae* e *H. pulchellus* con un clima más húmedo.

Una fuerte tendencia en los estudios ecogeográficos es el análisis de la variación en el tamaño corporal a través de un gradiente ambiental (Angilletta & Dunham, 2003).

Además, el estudio de la relación entre la temperatura y el tamaño corporal, ha sido de gran interés, impulsado por la observación de un patrón en diversas taxa: especies distribuidas en un amplio rango geográfico a menudo presentan clinas térmicas en correlación con el tamaño corporal, en donde los adultos de la mayoría de las especies presentan mayor tamaño en ambientes más fríos (Bernardo & Agosta, 2003; Angilletta *et al.*, 2004). Esta variación geográfica en el tamaño del cuerpo es conocida como la regla de Bergmann que establece que los individuos de las especies que habitan ambientes con clima relativamente fríos tienden a ser más grandes que aquellos que habitan ambientes más cálidos (Angilletta *et al.*, 2004; de Queiroz & Ashton, 2004).

Si bien esta regla está basada en organismos endotermos, también es aplicada en numerosas especies de ectotermos (de Queiroz & Ashton, 2004). Incluso, estudios de laboratorio han demostrado que una reducción de la temperatura del medio ambiente provoca un aumento en el tamaño adulto en la mayoría de ectotermos (Atkinson, 1994, 1995; Atkinson *et al.*, 2003). Algunas especies de anfibios muestran un mayor tamaño corporal en climas fríos que en climas cálidos; son considerablemente más grandes a niveles altitudinales mayores que sus congéneres en altitudes más bajas. Posiblemente esto se deba al mayor efecto fisiológico de las bajas temperaturas sobre el desarrollo, más que sobre el crecimiento, pudiendo a su vez retrasar la madurez sexual (Wells, 2007).

Esto también se observa en las larvas, Méndez *et al.* (2004) discuten el probable efecto de la temperatura del agua en la morfología y desarrollo larval, aguas más cálidas inducen un tamaño más pequeño en la metamorfosis, que a su vez determina un menor tamaño en el adulto.

Relacionado también al clima, la regla de Bergmann establece que el tamaño del cuerpo aumenta con la latitud (Schäuble, 2004). En *H. cordobae* también se observó un incremento en el tamaño corporal en función de la latitud; es decir, una variación clinal de norte a sur de aumento en el SVL.

Sin embargo, las regresiones entre las variables morfométricas y la latitud de las cuatro especies en conjunto mostraron una relación significativa negativa, una disminución del tamaño corporal en función de la latitud, lo cual no puede ser explicado en relación a las cuestiones climáticas y la regla de Bergmann. Sin embargo, los niveles latitudinales se correlacionan con los niveles altitudinales, las localidades que se encuentran más al norte son aquellas cuyos niveles altitudinales son también mayores, por lo cual, la correlación con la latitud podría deberse en verdad a la correlación del SVL y la altitud de las poblaciones estudiadas.

Castellano & Giacoma (2000) proponen una segunda explicación, argumentando que el tamaño corporal de los individuos puede ser reflejo de su edad. En anfibios anuros, el tamaño corporal de los adultos depende de numerosos factores, incluyendo el tiempo de metamorfosis, la tasa crecimiento antes y después de la madurez, la edad de madurez y la longevidad (Rosso *et al.*, 2004); por lo cual, si bien se encontraron

diferencias morfométricas entre las especies, estas podrían deberse también a la edad de los individuos.

Además, se debe tener en cuenta, que los anfibios presentan una limitada capacidad de dispersión y filopatría (Seppä & Laurila, 1999), permitiendo esto la acumulación de diferencias genéticas y morfológicas (Blouin & Brown, 2000; Camp *et al.*, 2000; Miaud & Merilä, 2001).

Eritrometría

Como está descripto por varios autores para las especies de anfibios (Davies, 1961; Duellman & Trueb, 1994; Atatür *et al.*, 1999; Zhelev *et al.*, 2006; Arserim & Mermer, 2008; Dönmez *et al.* 2009; Arikan *et al.*, 2010) las cuatro especies analizadas presentan eritrocitos con forma ovalada, con sus núcleos también ovalados y centralmente localizados. En la mayoría de las células sanguíneas el eje mayor del núcleo se encuentra paralelo al eje mayor del eritrocito.

La mayoría de los estudios hematológicos en diferentes especies de anfibios están basados en conteo de células sanguíneas (Atatür *et al.*, 1998; Atatür *et al.*, 1999; Zhelev *et al.*, 2006; Dönmez *et al.*, 2009). Sin embargo, se conoce que en anfibios hay un extenso rango en el tamaño de los eritrocitos, y que en comparación con otros organismos, sus células sanguíneas son grandes (Duellman & Trueb, 1994; Campbell, 2004). Además, existen algunos estudios que reportan acerca del tamaño de las mimas (Matson, 1990; Atatür *et al.*, 1998; Atatür *et al.*, 1999; Grenat *et al.* 2009a, b).

En este trabajo los resultados presentados indican una similitud entre las cuatro especies estudiadas en cuanto a tamaño y forma de los eritrocitos y sus núcleos. Debido a que los eritrocitos de los anfibios conservan su núcleo, el tamaño de los mismos se encuentra correlacionado con el contenido de DNA (Uzzell, 1964; Beçak & Goissis, 1971; Olmo & Morescalchi, 1975; De Smet, 1981; Horner & MacGregor, 1983; Stöck & Grosse, 1997; Schröer & Greven, 1998; Cianciarullo *et al.*, 2000; Gregory, 2001). La demostración más simple de la relación entre el contenido de DNA y el tamaño celular esta proporcionada por la ploidía, en donde todo el juego de cromosomas se duplica, de manera que las diferencias en el contenido de DNA entre las especies son grandes y fáciles de cuantificar (Gregory, 2001). Por esta razón, hoy en día el tamaño de los

eritrocitos es utilizado como herramienta para la distinción de especies relacionadas con diferentes niveles de ploidía (Atatür *et al.*, 1999; Martino & Sinch, 2002; Grenat, 2006; Grenat *et al.*, 2009a, b; Gao *et al.*, 2007; Valetti *et al.*, 2009).

En el caso de las cuatro especies estudiadas, el nivel de ploidía es el mismo ($2n=24$), por lo cual era esperable que el tamaño de sus eritrocitos sean similares.

Sin embargo, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en cuanto al tamaño de los eritrocitos entre las cuatro especies estudiadas, con valores superiores para *H. cordobae*. Esto podría deberse a un mayor tamaño del genoma en esta especie, ya que, al comparar los parámetros del complemento cromosómico de esta especie e *H. pulchellus*, se pudo observar que las medidas cromosómicas de *H. cordobae* son mayores a las de *H. pulchellus*.

Además, particularmente para *H. cordobae* los resultados mostraron una relación significativa negativa entre las Áreas de los eritrocitos y núcleos con el nivel altitudinal de las seis poblaciones en estudio.

Existen diversos motivos por los cuales el tamaño de los eritrocitos es relevante para la biología del organismo; uno es el hecho de que eritrocitos más grandes contienen mayor cantidad de hemoglobina, y esto junto a otros parámetros son de importancia en la fisiología del organismo (Gregory, 2001). El tamaño y la forma de los eritrocitos son indicadores de la superficie disponible para el intercambio de gases en las funciones respiratorias; por lo cual, el estudio de los eritrocitos en diferentes especies provee una interesante comparación del tamaño de los eritrocitos en relación a la actividad y el hábitat (Hartman & Leesler, 1964; Martínez *et al.*, 1985).

Una de las funciones más importantes de los eritrocitos es el transporte de oxígeno y dióxido de carbono; y su relación superficie-volumen es un factor determinante en el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los tejidos; por lo tanto, eritrocitos pequeños ofrecen mayor posibilidad de tasa de cambio que un eritrocito más grande (Hartman & Leesler, 1964; Sevinc *et al.*, 2000; Wojtaszek & Adamowicz, 2003).

Además, numerosos trabajos reportan que existe una correlación entre la altitud y el recuento de células sanguíneas (Ruiz *et al.*, 1993; Atatür *et al.*, 2001; Weber, 2007; Arikan *et al.*, 2010), y si bien ese parámetro no fue estimado en este trabajo, diversos autores manifiestan que el número y el tamaño de los eritrocitos se correlacionan de

manera negativa, de tal forma que a menor número de eritrocitos aumenta la superficie de los mismos (Wojtaszek & Adamowicz, 2003; Arikan *et al.*, 2010). También se plantea el hecho de que en anuros el conteo y tamaño de los eritrocitos varía inversamente con la actividad metabólica de los animales, indicando que las especies más activas tienen eritrocitos más pequeños, mientras que aquellas con menor consumo de oxígeno presentan eritrocitos de mayor tamaño (Atatür *et al.*, 1999; Wojtaszek & Adamowicz, 2003; Arserim & Mermer, 2008). Ruiz *et al.* (1989) al realizar comparaciones de poblaciones de *Bufo spinulosus* a diferentes niveles altitudinales pudieron comprobar que los individuos de las poblaciones más elevadas tenían menor tamaño de los eritrocitos, un aumento en la concentración de hemoglobina y una tendencia a un mayor conteo de glóbulos rojos, considerando que estas características pueden contribuir a su éxito de vida en las alturas.

Tal como lo plantean estos autores y por lo demás mencionado, se podría explicar el hecho de que en *H. cordobae* aquellas poblaciones que se encuentran a mayor nivel altitudinal, presenten eritrocitos más pequeños, ofreciendo mayor tasa de intercambio gaseoso, ya que en altitudes mayores sería necesario un mayor nivel de metabolismo y por lo tanto un mayor consumo de oxígeno.

Sin embargo, en la comparación entre las cuatro especies, los análisis de regresión entre el área de los eritrocitos y núcleos, y la altitud mostró que solo el área de los eritrocitos se correlaciona con el nivel altitudinal de las localidades, pero esta correlación es positiva, por lo cual no podría ser explicado de acuerdo a la relación superficie-volumen en la función de intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los tejidos, explicado anteriormente.

Respecto a la relación entre el SVL y el tamaño de los eritrocitos, solo en *H. cordobae* y en el análisis conjunto de los datos se presentó una relación significativa negativa entre el SVL y el área de los eritrocitos. Esto difiere a lo encontrado por otros autores. Los trabajos recientes de Davis (2008) y Davis *et al.* (2009) en salamandras han mostrado una correlación positiva entre el tamaño del cuerpo (SVL) y el tamaño de los eritrocitos; al igual que el trabajo de Grenat *et al.* (2009) en donde estas dos variables también muestran correlación positiva para individuos de *Odontophrynus americanus* tanto juveniles como adultos.

Citogenética

El número diploide de cromosomas $2n = 24$ es común dentro de los anuros y se presenta en especies de varias familias (Kuramoto, 1990). La mayoría de las especies de la subfamilia Hylinae tienen un número cromosómico diploide en un rango entre 22-34 cromosomas (Morescalchi, 1973; King, 1990). Según Miura (1995) la aparición de las especies de *Hyla* (actualmente *Hypsiboas*) con $2n = 24$ puede estar relacionada con un ancestro común con $2n = 26$; apoyado en Bogart (1963) que sugiere que en especies con cariotipos morfológicamente similares puede considerarse que comparten un ancestro común. Uno de los posibles mecanismos que explica el cambio de $2n = 26$ a $2n = 24$ puede estar relacionado con la fusión céntrica (Morescalchi, 1990); mientras que aquellas especies con un nivel de ploidía menor al de $2n = 24$ probablemente ha tenido su origen en los cariotipos con $2n = 24$ (Bogart, 1973).

La mayoría de las especies del género *Hypsiboas* tienen $2n = 24$ (Morescalchi, 1973; King, 1990). Particularmente para las cuatro especies estudiadas el número diploide encontrado es el mismo ($2n = 24$) y concuerda con lo descrito por otros autores para cada especie (Morescalchi, 1973; King, 1990; Barale *et al.*, 1991). Además, los cariotipos de *H. cordobae*, *H. pulchellus*, *H. riojanus* e *H. andinus* fueron muy similares a los de otras especies del "gupo *pulchella*" (*H. caingua*, *H. prasinus*, *H. joaquina*, *H. semiguttatus*, *H. marginatus*) (Baldissera *et al.*, 1993; Ananias *et al.*, 2004).

La morfología cromosómica metacéntrica o submetacéntrica determinada para *H. pulchellus* e *H. cordobae* también es la misma, coincidiendo con King (1990). Sin embargo, se observaron algunas diferencias en el tamaño de los cromosomas, siendo mayores los cromosomas de *H. cordobae*; aunque la diferencia mayor entre estos cariotipos se observó en los patrones de Bandas-C.

Nuestros resultados respecto a la morfología cromosómica de estas dos especies muestran que el par 1 y 8-12 son cromosomas metacéntricos, mientras que los pares 2-7 son cromosomas submetacéntricos. Esto coincide con lo reportado por Barale *et al.* (1991) para *H. cordobae*, excepto el par 2 que para estos autores presentan morfología metacéntrica y para los pares 4 y 6 que para los autores presentan morfología subterminal. Para *H. pulchellus* nuestros resultados difieren con lo presentado por Ananias (1996) respecto a la morfología submetacéntrica de los pares 9 y 10, y la morfología acrocéntrica del par 6.

Respecto al análisis meiótico, las cuatro especies revelaron 12 bivalentes en diacinesis y 12 cromosomas en Meiosis II. En algunas células los bivalentes presentaron una configuración cerrada en forma de anillo, exhibiendo dos quiasmas terminales; pero frecuentemente, en *H. cordobae* e *H. pulchellus*, el par cromosómico 1 presentó solo un quiasma terminal, mostrando una configuración abierta en forma de cadena. Estas configuraciones meiótica también fueron observadas por Baldissera *et al.* (1993) para *H. prasinus*, especie que también pertenece al "grupo *pulchella*".

El patrón de Bandas-C de *H. cordobae* e *H. pulchellus* es el patrón típico encontrado en anuros de acuerdo a Schmid *et al.* (1990), que señalan que las regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas son las regiones de ubicación preferencial de la heterocromatina en estos organismos.

Estas dos especies estudiadas presentan el mismo patrón de heterocromatina constitutiva en la región centromérica de todos los pares y tienen el mismo patrón de bandas pericentroméricas en los cromosomas de los pares 4, 5 y 9-12. También muestran el mismo patrón de Bandas-C en la región telomérica del brazo largo de los pares 4-6 y 9.

Sin embargo, también se encontraron diferencias en el patrón de Bandas-C entre *H. cordobae* e *H. pulchellus*, y estas diferencias pueden ser reconocidas como especie-específicas. El bandeo cromosómico es una herramienta importante en la citogenética comparativa (Baldissera *et al.*, 1993), y la comparación entre especies del patrón de bandeo son importantes para estudios citotaxonómicos (Schmid, 1978a; Schmid *et al.*, 1990; Baldissera *et al.*, 1993). Se ha demostrado que, aunque muchas especies de anfibios tienen una similitud compartida en el número de cromosomas y morfología (como lo muestran los resultados de este trabajo para estas dos especies) puede haber diferencias amplias en la posición y la cantidad de heterocromatina (Schmid, 1978a; Schmid *et al.*, 1990).

Además, el patrón de heterocromatina constitutiva de *H. pulchellus* en comparación con el patrón estudiado para otras especies del "grupo *pulchella*" revela similitudes en el bandeo-C, ya que en varias especies como *H. prasinus* (Baldissera *et al.*, 1993), *H. joaquina* (Ananias, 1996) *H. semiguttatus* e *H. marginatus* (Ananias *et al.*, 2004) se observa la banda telomérica en el par 1, al igual que lo encontrado en este

trabajo. Sin embargo, Ananias (1996) indica que esta banda no está presente en *H. pulchellus*.

En este trabajo se reconfirma el mismo número diploide para las cuatro especies estudiadas, aunque se observaron diferencias leves en cuanto a patrón de heterocromatina entre *H. cordobae* e *H. pulchellus*. Sin embargo, las especies muestran también idéntica morfología cromosómica, indicando que ellas se encuentran estrechamente relacionadas.

Bioacústica

Para las cuatro especies en estudio, diversos autores muestran que difieren en el canto de advertencia como así también en su morfometría (Barrio, 1965; Basso & Basso, 1987; di Tada *et al.*, 1996a; Faivovich *et al.*, 2004); sin embargo, en estos trabajos solo se describe el canto de advertencia, pero ninguno explora cuantitativamente el efecto de la temperatura sobre las diferentes variable, ni realizan una comparación entre especies con métodos estadísticos multivariados.

Los resultados de este trabajo coinciden de manera general con la descripción del canto de advertencia realizado por diversos autores para cada una de las cuatro especies de *Hypsiboas* aquí estudiadas. El canto es descrito como un canto tonal, no pulsado, formado por una serie de notas (de dos a siete notas) (Barrio, 1962, 1965; Cei, 1980; Basso & Basso, 1987; Márquez *et al.*, 1993; di Tada *et al.*, 1996a; Salas *et al.*, 1998; Baraquet *et al.*, 2007; Duellman *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 2010) y se las ha escuchado cantando de manera individual o formando coros (Basso & Basso, 1987).

El lugar de canto (ríos o arroyos; sobre suelo, rocas o vegetación; semisumergidos) observado coincide con lo descrito por diversos autores para las cuatro especies en estudio (Barrio, 1965; Cei, 1980; Gallardo, 1987; Márquez *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 1998).

Una característica de las cuatro especies es la emisión del sonido simple, diferente a las notas características del canto. Este sonido es emitido una o varias veces cuando el individuo comienza a cantar, tal como lo describe Barrio (1962, 1965) para cada una de las cuatro especies; sin embargo, se ha observado que este sonido simple también es emitido entre cantos o al finalizar los mismos. Para Barrio (1962) este sonido presenta

una duración promedio de 130ms, coincidiendo de manera general con lo presentado en este trabajo por *H. cordobae* (124.52ms), *H. riojanus* (110.92ms) y *H. andinus* (113.8ms); sin embargo para *H. pulchellus* la duración promedio fue menor a la presentada por este autor (71ms). Barrio (1962) al igual que en este trabajo, indica que este sonido es único y completamente diferente al canto básico de la especie; cuestión que se ve reflejada en las frecuencias de dichos sonidos, las cuales en general son menores a las del canto del mismo individuo, y en las duraciones del mismo, que son menores a la duración total del canto y mayores a la duración de una nota.

Se ha observado para cada especie diferentes tipos de canto, de acuerdo al número de notas de por canto, los cuales se diferencian en su duración y en su frecuencia dominante. Esta diferencia es la más notable entre las cuatro especies estudiadas y coincide con la descripción básica realizadas por diferentes autores para cada especie, *H. cordobae* (Barrio, 1965; Cei, 1980; di Tada *et al.*, 1996a), *H. pulchellus* (Barrio, 1962; Barrio, 1965; Cei, 1980; Basso & Basso, 1987; Salas *et al.*, 1998; Baraquet, *et al.* 2007), *H. riojanus* (Barrio, 1965; Köhler *et al.*, 2010) e *H. andinus* (Barrio, 1965; Márquez *et al.*, 1993; Duellman *et al.*, 1997; Köhler *et al.*, 2010).

Sin embargo, para *H. cordobae* Barrio (1965) y di Tada *et al.* (1996a) manifiestan para la especie la existencia de cantos formados por tres y cuatro notas, mientras que este trabajo muestra también para esta especie cantos formados por cinco notas. Además, el mayor porcentaje de cantos corresponden a cantos de cuatro notas, mientras que di Tada *et al.* (1996a) en las tres poblaciones que estudiaron el mayor porcentaje fue de cantos de 3 notas. De igual manera, para *H. riojanus* Barrio (1965) muestra cantos formados por tres y cuatro notas, mientras que nuestros resultados muestran también cantos formados por cinco notas. Para *H. pulchellus*, Basso & Basso (1987) en la descripción del canto de la especie indican que el canto está formado por cuatro notas agrupadas de a dos, mientras que los resultados de este trabajo no muestran esta estructura, debido a que básicamente, el canto de esta especie ha presentado solo dos notas. *Hypsiboas andinus* es la especie que ha presentado mayor número de notas en el canto, ya que se observaron cantos de entre tres y siete notas, tal como lo cita Barrio (1965) y Kohler *et al.*, (2010). Sin embargo, para este último autor, la especie también puede presentar cantos formados por dos notas, no observados en nuestros resultados. Márquez *et al.* (1993) para esta especie describe que el canto está compuesto por dos

notas, aclarando que ocasionalmente el canto se ve alterado presentando cantos con una y hasta cuatro notas; mientras que para Duellman *et al.* (1997) esta especie presenta cantos compuestos de dos y tres notas.

Respecto a los cantos de una nota de *H. pulchellus*, y de dos notas de *H. cordobae* e *H. riojanus* que alteran el patrón básico del canto, coincide con lo reportado por otros autores, indicando que el canto puede verse modificado de diferentes maneras (Barrio, 1965; Vasara *et al.*, 1991; Márquez *et al.*, 1993; Baraquet *et al.*, 2007).

Los valores de las variables acústicas del canto de advertencia de *H. pulchellus* (duración del canto, duración de la nota uno, duración de la nota dos y frecuencia dominante del canto) de los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los presentados por Barrio (1962; 1965), Salas *et al.* (1998) y Baraquet *et al.* (2007).

Para *H. cordobae*, los valores obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por di Tada *et al.* 1996a, en que los tipos de canto difieren en su duración, siendo la nota final la de mayor duración, y las demás notas con una duración promedio similar. Sin embargo, la duración de la nota tres (DN3) y la duración de la nota cuatro (DN4) tienen valores menores y menor es el rango de la Frecuencia Dominante, comparado con los valores obtenidos en este trabajo.

Kohler *et al.*, (2010), en el análisis de cantos de *H. andinus*, muestran valores similares a los presentados en este trabajo. Márquez *et al.* (1993) para las dos notas por las que dice estar compuesto el canto, muestra valores de 180ms (135-216) y 110ms (83-145ms), respectivamente. Estos valores son superiores a los presentados en este trabajo, ya que para esta especie, las notas analizadas se encuentran en un rango entre 12 y 78ms, al igual que lo presentado por Duellman *et al.* (1997). Sí coincide en el hecho de que la nota uno es mayor a la nota dos; ya que para *H. andinus* como para *H. riojanus* la nota uno en general es de mayor duración que las demás notas; inversamente a lo que sucede en *H. cordobae* e *H. pulchellus*, donde la nota final es de mayor duración a las demás, y comparativamente, el canto de tres notas de *H. cordobae* es el más similar al de *H. pulchellus*.

Respecto a los valores de frecuencias, tanto Márquez *et al.* (1993) como Duellman *et al.* (1997) presentan para la especie valores que oscilan entre los 1600 y los 2100, con una media de 1785.6 o 1861.3, en coincidencia con los valores presentados en este trabajo; mientras que Kohler *et al.* (2010) muestran un rango de entre 1700 y 2800 Hz.

La TC presentada por Márquez *et al.* (1993) de 14.5 (11-21) es considerablemente menor a la que se obtuvo con los resultados aquí planteados (media 36 c/m; rango 20-78 c/m).

Varios autores señalan que las variables del canto se ven afectadas por algunos parámetros climáticos como la temperatura y la humedad (Barrio, 1963; Schneider, 1977; Brenowitz, 1986; Platz, 1988; Ryan & Wilczynski, 1991; Vasara *et al.*, 1991; Schneider & Sinsch, 1992; Schneider *et al.*, 1993; Duellman & Trueb, 1994; di Tada *et al.*, 1996a); sin embargo, ninguno de ellos valora cuantitativamente el efecto de estos parámetros sobre las propiedades acústica.

En este trabajo, la DC siempre mostró relación significativa con la temperatura, y en todos los casos esta relación fue negativa; y varios autores presentan resultados coincidentes. Schneider (1977) considera que la duración del canto es dependiente de la temperatura en un gran número de anuros. Platz (1988) experimentó con machos adultos de la especie *Pseudacris triseriata maculata* determinando que la duración del canto es una variable dependiente de la temperatura. Barrio (1963), al estudiar la influencia de la temperatura del aire sobre el canto nupcial de *Hyla squalirostris*, comprobó que tanto la duración del trino como el intervalo entre trinos, poseen una correlación negativa con la temperatura ambiente. Resultados similares presentó Vasara *et al.* (1991), en su trabajo, donde la duración del canto y el intervalo entre cantos disminuyen significativamente, cuando la temperatura aumenta. Bionda (2008) al analizar el canto de *Physalaemus biligonigerus* también determinó una correlación negativa entre las dos variables, al igual que Baraquet *et al.* (2007) al analizar cantos de advertencia de *Hypsiboas pulchellus*. Lüddecke & Sánchez (2002) analizaron el canto de advertencia de *Hyla labialis* obtenidos en laboratorio a un amplio rango de temperatura, logrando como resultado una correlación significativa y negativa entre la temperatura y la duración del canto.

La tasa de canto en nuestro estudio fue la única variable temperatura-dependiente que aumenta con el ascenso de la temperatura (con excepción de la DN2 en *H. pulchellus*), este resultado también coincide con lo presentado por otros autores (Barrio, 1963; Vasara *et al.*, 1991; Baraquet *et al.*, 2007).

En cuanto a las variables espectrales, solo para *H. cordobae* presentaron relación significativa con la temperatura. En los demás análisis, las variables espectrales

resultaron independientes de la temperatura, tal como lo señalan diversos autores (Barrio, 1963; Bionda, 2008; Baraquet *et al.*, 2007). Esto puede deberse a la relación entre las variables espectrales y el tamaño del macho, que será explicado en detalle más adelante.

La comparación acústica entre las cuatro especies reveló que *H. pulchellus* es quien más se diferencia de las otras tres especies. *H. cordobae* mostró características intermedias entre *H. pulchellus* e *H. riojanus*-*H. andinus*, ya que presentó valores similares a *H. pulchellus* en cuanto a la duración de las notas y en que la nota final es de mayor duración que las demás. Sin embargo, los valores de frecuencias de *H. cordobae* fueron intermedios, y en cuanto a número de notas por canto se asemeja a *H. riojanus*-*H. andinus*. Por su parte, *H. riojanus* e *H. andinus* mostraron características acústicas similares entre sí. Particularmente en la Duración de la Nota Dos no se encontraron diferencias significativas entre *H. pulchellus* e *H. riojanus*. Esto puede deberse a que *H. pulchellus* presenta cantos con solo dos notas, siendo la nota dos la nota final, y la de mayor duración, mientras que *H. riojanus* presenta cantos de tres, cuatro y cinco notas, siendo en general todas las notas de una duración superior a las notas de *H. pulchellus* e *H. cordobae*, asemejándose entonces su DN2 con la DN2 de *H. pulchellus*, que es su nota final.

Las Frecuencias Dominantes del canto de las cuatro especies variaron también entre ellas, siendo mayor en *H. pulchellus* (2331,99 Hz), intermedia en *H. cordobae* (1908,53 Hz), y significativamente menor en *H. riojanus* e *H. andinus* (1712,22-1731,38 Hz respectivamente). En *H. pulchellus* e *H. cordobae*, se observó un leve aumento de Frecuencias Dominantes de las primeras a las últimas notas, siendo la Frecuencia Dominante del canto, por lo general, la misma que la de la Frecuencia Dominante de la nota final; mientras que en *H. riojanus* e *H. andinus* la Frecuencia Dominante de la primera notas fue mayor que la de las restantes, y la Frecuencia Dominante del canto se corresponde con la Frecuencia Dominante de la primera o última nota.

Estas diferencias en las Frecuencias Dominantes se correlacionan con las diferencias morfométricas encontradas entre las cuatro especies. En ambas variables (sobre todo el largo total -SVL) *H. pulchellus* presenta valores extremos (menores en SVL y mayores en frecuencia), *H. cordobae* valores intermedios, e *H. riojanus* junto

con *H. andinus* presentan valores en el otro extremo (mayores tamaño -SVL- y menores frecuencias). Las frecuencias de las señales acústicas en anuros están parcialmente determinadas por la forma y masa del aparato laríngeo y correlacionado con el tamaño del cuerpo. Un incremento en las cuerdas vocales, cartílago y caja de resonancia, en animales grandes, produce sonidos más bajos y con un valor menor de frecuencia dominante (Duellman & Trueb, 1994; McClelland *et al.*, 1996; Wells, 2007). Tal como lo muestran los resultados del presente trabajo, muchos estudios de bioacústica corroboran que el tamaño de los machos cantores está negativamente correlacionado, con la Frecuencia Dominante del canto de advertencia (Blair 1958,1964; Ryan & Wilczynski, 1991; Ryan, 1985; Duellman & Pyles, 1983; Narins *et al.*, 1986; Platz, 1988; Schneider & Steinwarz, 1990; Gerhardt, 1994; Kanamadi *et al.*, 1994; Cocroft & Ryan, 1995; Sullivan *et al.* 1996; Burmeister *et al.*, 1999; Bee *et al.* 2000; Bosch *et al.* 2000; Bee & Gerhardt, 2001; Bee, 2002; Bernal *et al.*, 2004; Scroggie & Littlejohn, 2005).

Además, las diferencias interespecíficas en el tamaño y forma de la laringe en anuros sugieren que distintas fuerzas de selección pueden operar directamente sobre la estructura de la laringe, garantizando que cada especie produzca vocalizaciones únicas. Así, en general, las características espectrales del canto de los anuros están influenciadas por la morfología de la laringe y la cavidad bucal, mientras que la estructura temporal se debe en parte a los movimientos de la propia laringe (McClelland *et al.*, 1996).

Debido a esto último, un individuo puede variar la la estructura temporal a través de los movimientos de la laringe. Los resultados de este trabajo demuestran variaciones inter e intraespecíficas en las variables el Intervalo Entre Cantos y la Tasa de Canto. La interferencia acústica en los coros grandes ha sido resuelta por parte de los anuros, los machos tienden a alternar sus cantos con los de los vecinos cercanos, para evitar la superposición (Kanamadi *et al.*, 1994; Bosch & Márquez, 2000; Vitt & Caldwell, 2009). Además, diversos autores han demostrado que los machos anuros pueden cambiar características de su canto como reflejo del contexto social en el que se encuentran cantando (Schwartz, 1989; Burmeister *et al.*, 1999; Gerhardt & Huber, 2002; Bernal *et al.*, 2004; Smith & Hunter, 2005). Por ejemplo, es posible encontrar alteraciones en los patrones o propiedades temporales del canto de advertencia: se pueden elevar la tasa,

complejidad, duración e intensidad de sus cantos, para reducir la posibilidad de interferencia acústica o interferencia con otros machos vecinos (Narins *et al.*, 1986; Schwartz *et al.*, 2002). Ryan & Wilczynski (1991) plantean que características temporales del canto difieren de acuerdo a la posición dentro del grupo de canto, y que los machos tienden a incrementar las características temporales del canto como respuesta agresiva a la vocalización de otros machos.

La respuesta más común de un macho frente a otro macho competidor es el incremento en su Tasa de Canto, por lo que, tal como pudo observarse en este trabajo, cuando un individuo canta solo, especialmente cuando comienza su canto, la Tasa de Canto es menor, mientras que cuando el individuo canta en coro la Tasa de Canto se incrementa (Schwartz & Wells, 1985; Bosch *et al.*, 2000; Bosch & de La Riva, 2004; Bernal *et al.*, 2007). Bernal *et al.* (2004) atribuyen esta variación a que al estar cantando en coro los individuos incrementan la Tasa de Canto para hacer más fácil su localización y así demostrar territorialidad, además de que está probado que las hembras seleccionan a aquellos machos cuya Tasa de Canto es mayor (Bosch & Marquez, 2005; Smith & Roberts, 2003; Bee *et al.*, 2009). Incluso, en muchas especies los machos incrementan su Tasa de Canto en respuesta a la proximidad de la hembra (Wells, 2007).

Los análisis discriminantes permitieron diferenciar a las cuatro especies estudiadas. Los porcentajes de casos correctamente clasificados fueron altos, Schneider & Sinsch (1992) consideran los porcentajes de clasificación errónea como una medida cuantitativa de la variabilidad local del canto de advertencia, que puede ser distinguida de las diferencias taxonómicas entre poblaciones, y aclaran que porcentajes de clasificación erróneas por debajo del 20% son considerados una evidencia de variación al azar. Los resultados de este trabajo muestran porcentajes de clasificación erróneas bajos, en la mayoría de los casos menores al 20%, lo cual sería evidencia de una baja variabilidad intraespecífica, y sí una variación en el canto entre especies.

Comparaciones del canto de advertencia inter e intraespecíficas han sido utilizadas para analizar la influencia de la variación geográfica y el establecimiento de patrones filogenéticos (Cocroft & Ryan, 1995).

Debido a la naturaleza específica del canto de advertencia, algunos autores sugieren que estas características deben mostrar poca variación intraespecífica (Castellano & Giacoma, 2000). Sin embargo, en *H. cordobae* se observaron variaciones

significativas entre poblaciones. Esta variación geográfica en el canto de advertencia observada entre poblaciones de una misma especie es común en anuros (Bernal *et al.*, 2005), y ha sido estudiada en diversas especies (Ryan & Wilczynski, 1991; Ryan *et al.*, 1996; Castellano & Giacoma, 2000; Smith *et al.*, 2003b, c; Smith & Hunter, 2005; Baraquet *et al.*, 2007; Pröhl. *et al.*, 2007).

La variación clinal en las características del canto ha sido descrita para varias especies de anuros (Gerhardt, 1982; Hasegawa *et al.*, 1999; Narins & Smith, 1986; Nevo & Capranica, 1985; Ryan *et al.*, 1996; Ryan & Wilczynski, 1991). En este trabajo se observa una variación clinal de sur a norte de disminución en la Frecuencia Dominante del Canto y Frecuencias de las notas en *H. cordobae*. Varios autores atribuyen esta variación al efecto de una variación clinal del SVL en aumento a lo largo de la misma clina (Bernal *et al.*, 2005; Pröhl, *et al.*, 2007); pero en los análisis de regresión entre el SVL y la latitud, se muestra una variación clinal de sur a norte de disminución del SVL. Además, al realizar el test de Mantel, las diferencias acústicas (distancias de Mahalanobis) no presentaron correlación significativa con las distancias geográficas.

Sin embargo, las regresiones entre las variables acústicas y los niveles altitudinales de las seis poblaciones de *H. cordobae*; como así también los análisis realizados para las cuatro especies en conjunto mostraron relación significativa negativa entre las variables espectrales y la altitud.

Diversos estudios han identificado un número de procesos que den explicación a la variación geográfica en el canto de advertencia, como por ejemplo, las diferentes condiciones ambientales (Gerhardt, 1991; Ryan & Wilczynski, 1991), la selección natural (Castellano & Giacoma, 2000), la selección sexual (Lande, 1982; West-Eberhardt, 1983; Endler & Houde, 1995; Gerhardt, 1994) o la variación geográfica en el tamaño corporal (Narins & Smith, 1986; Ryan & Wilczynski, 1991).

La variación altitudinal de las frecuencias puede atribuirse a la variación en el SVL que se mostraron tanto para las seis poblaciones de *H. cordobae*, como entre las cuatro especies. Es decir, que las poblaciones que presentan mayor nivel altitudinal mostraron SVL menores y Frecuencias más altas. Esto se explica por la relación entre el SVL de los machos cantores y sus frecuencias, explicada anteriormente. Esta misma correlación positiva entre el tamaño corporal y la altitud, y la correlación negativa entre

la altitud y la frecuencia fundamental del canto de advertencia se ha encontrado en especies como *Eleutherodactylus coqui* (Narins & Smith, 1986); por lo que estos autores indican que si el tamaño corporal y la frecuencia se encuentran correlacionados en anuros, es de esperar que cualquier cambio en un parámetro se verá acompañado por el correspondiente cambio en el otro; por lo tanto, el gradiente altitudinal de estos caracteres puede ser el resultado de la diferencia de selección de uno o ambos de estos caracteres.

Según Smith *et al.* (2003b) el canto puede indicar calidad genética, la compatibilidad con el macho y también puede variar según el tamaño y condición. En consecuencia, la variación en la estructura del canto de advertencia dentro y entre poblaciones puede reflejar un rango de presiones de selección natural y sexual o la deriva genética aleatoria.

Por esto, un posible agente causal de la variación geográfica de las señales de reconocimiento de su compañero es la selección sexual (Lande, 1982; West-Eberhardt, 1983; Ryan & Wilczynski, 1991). En este caso, la variación de la señal refleja las diferencias entre la población en las preferencias de pareja, que, a su vez, puede tener o no tener significado adaptativo (Endler & Houde, 1995; Gerhardt, 1994; Castellano & Giacoma, 2000).

Estudios sobre la selección sexual entre machos competidores han demostrado que los machos de algunas especies de anuros pueden evaluar el tamaño y la capacidad de lucha de los machos rivales en función del tamaño, relacionado con la variación en las propiedades espectrales del canto (Gerhardt & Bee, 2007). Otros estudios de selección sexual y la elección del macho por parte de la hembra, han demostrado que las hembras comúnmente prefieren cantos de baja frecuencia de machos grandes (Gerhardt & Huber, 2002).

Otra posible causa de la variación geográfica del canto de advertencia podría estar dada por la selección natural, ya sea selección del medio ambiente o selección en contra del apareamiento heteroespecífico (Castellano & Giacoma, 2000). Dado que la eficiencia del canto depende de las propiedades acústicas y del ambiente; diferencias ambientales pueden producir diferentes presiones selectivas y causar divergencia entre las poblaciones (Ryan & Sullivan, 1989; Ryan & Wilczynski, 1991).

Muchas de las variaciones geográficas en las características del canto pueden deberse a las diferencias climáticas de las distintas áreas de distribución que presentan las poblaciones. Los numerosos factores que influyen sobre las señales acústicas, hacen que las mismas puedan variar en un mismo individuo, entre individuos de una especie y entre poblaciones de una misma especie que se encuentran separadas geográficamente (Gerhardt, 1991; Ryan & Wilczynski, 1991). Por lo cual, los resultados de este trabajo permitieron discriminar entre las seis poblaciones de una misma especie (*H. cordobae*) y también entre las cuatro especies estudiadas.

Las cuatro especies estudiadas comparten características en sus cantos, reflejando su proximidad filogenética (Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que cada especie presenta un canto de advertencia típico, que la diferencia de las demás entidades. Esto último confirma que los cantos de advertencia son un mecanismo efectivo de aislamiento reproductivo, por lo que es útil en su utilización para la identificación de especies (Duellman & Trueb, 1994; di Tada *et al.*, 1996a).

CONSIDERACIONES FINALES

El desarrollo del presente trabajo de tesis ha posibilitado el estudio y análisis comparativo de cuatro especies del género *Hypsiboas*, presentes en el área central de Argentina: *H. cordobae*, *H. pulchellus*, *H. riojanus* e *H. andinus*. Se analizaron diferentes caracteres independientes, morfológicos (morfológicos), citológico (cariometría y eritrometría) y etológicos (bioacústicos), en cada una de las cuatro especies. A partir de los resultados y dada la coherencia interna de los datos relevados, las conclusiones que pueden obtenerse a partir de estos resultados podrían estar limitadas por el número de individuos y poblaciones consideradas en el presente análisis. El desarrollo y análisis de los resultados obtenidos en base a las discusiones realizadas en la sección anterior permiten considerar las siguientes conclusiones finales del presente trabajo.

-La descripción morfológica de las especies permite diferenciar a *H. cordobae*, *H. pulchellus* y las dos especies Andinas *H. riojanus*/*H. andinus*. Estas dos últimas especies no mostraron diferencias significativas entre sí. Esta diferenciación morfométrica sugiere una fuerte estructura geográfica probada mediante análisis de regresión en relación a la latitud y altitud de las localidades de muestreo, estructura que revela en parte las diferencias ambientales de las localidades de trabajo.

-La eritrometría de las cuatro especies es similar en cuanto a forma y tamaño, debido a que el nivel de ploidía de las especies es el mismo. Sin embargo, en *H. cordobae*, los eritrocitos son de mayor tamaño, relacionado a las medidas cromosómicas también de mayor tamaño que presenta esta especie. Este carácter también sugiere una estructura geográfica en *H. cordobae*, en relación a la fisiología de los organismos de acuerdo al nivel altitudinal del ambiente que habitan. Si bien se han encontrado diferencias entre el tamaño de los eritrocitos de las cuatro especies estudiadas, no es posible correlacionar estas diferencias con su nivel de ploidía, y tampoco se encontró relación con el tamaño del cuerpo de las especies.

-Las cuatro especies estudiadas presentan el mismo nivel de ploidía; con diferencias en los largos relativos de los cromosomas y el patrón de bandas-C. Respecto a las figuras meióticas, para *H. cordobae* e *H. pulchellus*, son las mismas; con diferencias respecto a las figuras meióticas de *H. riojanus* e *H. andinus*.

-La descripción de los cantos de advertencia, evaluando la influencia de la temperatura del aire sobre las variables acústicas, permite diferenciar a tres de las cuatro especies, al igual que en morfometría. Las diferencias acústicas sugieren una fuerte estructura geográfica en las variables espectrales, lo cual fue probado con un análisis de regresión en relación a la latitud y altitud de las localidades de muestreo. Esta variación se atribuye en parte a las diferentes condiciones ambientales de las localidades, a la selección natural, selección sexual o a variaciones en el SVL, debido a la correlación entre las variables espectrales y el tamaño del macho cantor.

Las diferencias morfológicas, de eritrometría, citogenéticas y bioacústicas entre *H. cordobae*, *H. pulchellus*, *H. riojanus* e *H. andinus* apoyan el hecho de que las cuatro especies sean consideradas especies distintas, y ya no como subespecies de *Hyla pulchella* (ahora *Hypsiboas pulchellus*).

Morfológicamente *H. cordobae* se agrupa con *H. pulchellus* (cluster análisis) y citogenéticamente son especies similares, por lo cual se considera válido el hecho de llamar a estas dos especies como “especies hermanas”.

Sin embargo, *H. cordobae* es una especie de mayor tamaño que *H. pulchellus*; y en eritrometría y canto de advertencia, *H. cordobae* está más relacionada a *H. riojanus* /*H. andinus*. Es decir, que *H. cordobae* es una especie intermedia entre *H. pulchellus* y las formas andinas *H. riojanus*/*H. andinus*.

H. riojanus e *H. andinus* están estrechamente relacionadas. Morfológicamente sólo se diferencian por la coloración, particularmente por la banda crema márgenes irregulares interrumpida por manchas amarronadas de cada lado del cuerpo que presenta *H. andinus*, pero debido a la variabilidad en la coloración de estas especies, no es un carácter diagnóstico fiable.

En cuanto a eritrometría, citogenética y canto de advertencia, estas dos especies no se diferencian significativamente, lo que sugiere que podrían ser designadas bajo el

mismo nombre. Diversos autores han manifestado que la relación entre *H. riojanus* y su especie hermana *H. andinus* no es clara (Barrio, 1965; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005), y que las diferencias morfológicas y acústicas entre ellas sugieren que los dos taxones no son probablemente especies reproductivamente aisladas (Koscinki *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta esta problemática, Köhler *et al.* (2010) realizaron una revisión del estatus taxonómica de las especies Andinas del “grupo *pulchella*”, en la cual determinaron que *H. riojanus* e *H. andinus* no presentan diferencias en morfología y acústica, por lo cual los autores consideran a la primera como un sinónimo de esta última.

Los datos de este trabajo también muestran que estas dos especies no se diferencian entre sí, y apoyan el hecho de ser consideradas como una misma especie.

Sin embargo, también se tiene presente que tanto estos autores como otros (Lavilla, 1980; Lavilla, 1984; Lavilla & Fabrezi, 1987; Márquez *et al.*, 1993; De la Riva *et al.*, 2000; Langone & Lavilla, 2002) ponen en evidencia la variabilidad interpoblacional de *H. andinus* en aspectos comportamentales, morfológicos, genéticos y acústicos, y muchos dejan claro que su situación taxonómica no está bien establecida (Duellman *et al.*, 1997; De La Riva *et al.*, 2000; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Koscinski *et al.*, 2008), por lo cual se hace necesario la realización de futuros estudios a lo largo del área de distribución de la especie para poder plantear conclusiones taxonómicas más amplias sobre *H. andinus*.

Finalmente, el presente trabajo ha permitido corroborar la clasificación de estos taxones propuestos en recientes trabajos (De La Riva *et al.*, 2000; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Koscinski *et al.*, 2008; Köhler *et al.*, 2010). El análisis de características morfológicas, de eritrometría, citogenéticas y bioacústicas permiten diferenciar a *H. cordobae*, *H. pulchellus* y las dos especies Andinas, y permiten también apoyar la sinonimia entre *H. riojanus* e *H. andinus*.



BIBLIOGRAFÍA

- AGUIAR, O. JR.; LIMA, A. P.; GIARETTA, A. A. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2002. Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura: Dendrobatidae). *Herpetologica*, 58(3): 293-303.
- AGUIAR, O. JR.; CARVALHO, K. A.; GIARETTA, A. A. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2004. Cytogenetics of *Hylodes* and *Crossodactylus* species (Anura, Leptodactylidae) with comments on Hylodinae/Dendrobatidae Relationships. *Genetica*, 121: 43-53.
- AIASSA, D.; GORLA, N.; AVILA, L. & MARTORI, R. 2001. Cariotipo de *Liolaemus koslowskyi* Etheridge, 1993. Nuevo número cromosómico para el género ($2n = 36$). *Revista Española de Herpetología*, 15: 37-43.
- ALMEIDA-GOMES, M.; VAN SLUYS, M. & DUARTE ROCHA, C. F. 2007. Calling activity of *Crossodactylus gaudichaudii* (Anura: Hylodidae) in an Atlantic Rainforest area at Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. *Belgian Journal of Zoology*, 137(2): 203-207.
- ALTMAN, P. L. & DITTMER, D. 1961. Blood and other body fluids. *Fed. Amer. Soc. Exptl. Biol.* Washington, D.C. 19. En: Harris, J. 1963. *The red cell*. Harvard University Press. Cambridge, Mass.
- AMARO-GHILARDI, R. C.; SILVA, M. J. J.; RODRIGUES, M. T. & YONENAGA-YASSUDA, Y. 2008. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica*, 134: 159-168.
- ANANIAS, F. 1996. Caracterização cromossômica de espécies e subespécies de *Hyla* do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). Tesis de Maestría, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.
- ANANIAS, F.; GARCÍA, P. C. A. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas*, 140: 42-48.
- ANANIAS, F.; GIARETTA, A. A. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2006. Cytogenetics of *Brachycephalus ephippium* (Anura, Brachycephalidae) with comments on its relationship to the Bufonidae. *Amphibia-Reptilia*, 27: 121-125.
- ANGILLETTA, M. J. & DUNHAM, A. E.. 2003. The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. *The American Naturalist*, 162: 332-342.

- ANGILLETTA, M. J.; STEURY, T. D. & SEARS, M. W. 2004. Temperature, Growth Rate, and Body Size in Ectotherms: Fitting Pieces of a Life-History Puzzle. *Integrative & Comparative Biology*, 44:498-509.
- ARIKAN, H.; OLGUN, K.; ÇEVİK, I. E. & TOK, C. V. 1998. A Taxonomical Study on the *Rana ridibunda* PALLAS, 1771 (Anura: Ranidae) Population from Ivriz-Eregli (Konya). *Turkish Journal of Zoology*, 22: 181-184.
- ARIKAN, H.; ALPAGUT-KESKIN, N; ETHEM ÇEVİK, I & ERIŞİMİŞ, U. C. 2010. A study on the blood cells of the fire-bellied toad, *Bombina orientalis* L. (Anura: Bombinatoridae). *Animal Biology*, 60: 61-68.
- ARSERİM, S. K. & MERMER, A. 2008. Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 25(1): 39-46.
- ARROYO S. B.; SÁNCHEZ, P. M.; RAMÍREZ-PINILLA, M. P.; SUÁREZ, H. A. & MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. 2005. Morphometric analysis to differentiate taxonomically seven species of *Eleutherodactylus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from an Andean cloud forest of Colombia. *Zootaxa*, 1018: 1-14.
- ARTURI, M. 2006. Situación Ambiental en la Ecorregión Espinal. En: Brown, A.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M. & Corchera, J. (Eds.). *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- ATATÜR, M. K.; ARIKAN, H & MERMER, A. 1998. Erythrocyte sizes of some Urodeles from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 22: 89-91.
- ATATÜR, M. K.; ARIKAN, H & ÇEVİK, I. E. 1999. Erythrocyte Sizes of Some Anurans From Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 23: 111-114.
- ATATÜR, M. K.; ARIKAN, H.; ÇEVİK, I. E. & MERMER, A. 2001. Erythrocyte Measurements of some Scincids from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 25: 149-152.
- ATKINSON, D. 1994. Temperature and organism size a biological law for ectotherms?. *Advances in Ecological Research*, 25:1-58.
- ATKINSON, D. 1995. Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: Exceptions to the general rule. *Journal of Thermal Biology*, 20: 61-74.

- ATKINSON, D.; CIOTTI, B. J. & MONTAGNES, D. J. S. 2003. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% 8C⁻¹. Proceedings of the Royal Society B, 270: 2605-2611.
- AVILA, L. J.; MORANDO, M. & PRIOTTO, J. M. 1999. Amphibia and Reptilia of the high grasslands of the Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina. Bulletin of the Maryland Herpetological Society. Department of Herpetology the Natural History Society of Maryland, inc. 35 (4): 97-113.
- BALDISSERA JR, F. A.; OLIVEIRA, P. S. L. & KASAHARA, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia- Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. Revista Brasileira de Genética, 16: 335-345.
- BARALE, G. D. DE, DI TADA, I. E. & LISANTI, J. A. 1991. Descripción del cariotipo y ubicación del organizador nucleolar en *Hyla pulchella cordobae* (Anura, Hylidae) de la Pampa de Achala. Revista Universidad Nacional de Río Cuarto, 1:31-34.
- BARAQUET, M. 2006. Análisis bioacústico de poblaciones de *Hypsiboas pulchellus* (Duméril & Bibron, 1841), (Anura, Hylidae). Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
- BARAQUET, M.; SALAS, N. E. & 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. 1962. Los Hylidae de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires. Observaciones sistemáticas, ecológicas y análisis espectrográfico del canto. Phycis, Revista de la Asociación Argentina de Ciencias Naturales. Tomo XXIII, N° 65: 129-142.
- BARRIO, A. 1964. Importancia, significación y análisis del canto de batracios anuros. Publicación Museo Provincial Ciencias Naturales "F. Ameghino", Santa Fe, pp. 51-79.
- BARRIO, A. 1965. Las subespecies de *Hyla pulchella* Duméril & Bibron (Anura, Hylidae). Phycis, Revista de la Asociación Argentina de Ciencias Naturales, Tomo XXV, N° 69: 115-128.
- BASSO, N. G. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuro. Cuadernos de Herpetología. Serie monografías N° 1.

- BASSO, N. G. & BASSO, G. 1987. Análisis acústico del canto de *Hyla pulchella pulchella* (Duméril & Bibron, 1841) (Anura: Hylidae). *Anales Museo de Historia Natural*, 18: 109-114.
- BEÇAK, W. & GOISSIS, G. 1971. DNA and RNA content in diploid and tetraploid amphibians. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 27: 345-346.
- BEE, M. A.; PERRILL, S. A. & OWEN, P. C. 2000. Male green frogs lower the pitch of acoustic signals in defense of territories: a possible dishonest signal of size?. *Behavioral Ecology*, 11 (2): 169–177.
- BEE, M. A. 2002. Territorial male bullfrogs (*Rana catesbeiana*) do not assess fighting ability based on sizerelated variation in acoustic signals. *Behavioral Ecology*, 13: 109-124.
- BEE, M. A. & GERHARDT, H. C. 2001. Neighbour–stranger discrimination by territorial male bullfrogs (*Rana catesbeiana*): I. Acoustic basis. *Animal Behaviour*, 62: 1129-1140.
- BEE, M. A.; COOK, J. M.; LOVE, E. K.; O'BRYAN, L. R.; PETTITT, B. A.; SCHRODE, K. & VÉLEZ, A. Assessing Acoustic Signal Variability and the Potential for Sexual Selection and Social Recognition in Boreal Chorus Frogs (*Pseudacris maculata*). *Ethology*, 116: 564-576.
- BERNAL, M. H.; MONTEALEGRE, D. P. & PÁEZ, C. A. 2004. Estudio de la vocalización de trece especies de anuros del municipio de Ibagué, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 28: 385-390.
- BERNAL, X. E.; GUARNIZO, C. & LÜDDECKE, H. 2005. Geographic variation in advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura, Dendrobatidae) from the Colombian Andes. *Herpetologica*, 61(4): 395-408.
- BERNAL, X. E.; PAGE, R. A.; RAND, A. S. & RYAN, M. J. 2007a. Cues for Eavesdroppers: Do Frog Calls Indicate Prey Density and Quality?. *The American Naturalist*, 169 (3): 409-415.
- BERNAL, X. E.; RAND, A. S. & RYAN, M. J. 2007b. Sex differences in response to nonconspecific advertisement calls: receiver permissiveness in male and female túngara frogs. *Animal Behaviour*, 73: 955-964.
- BERNARDO, J. & AGOSTA, S. J. 2003. Determinants of clinal variation in life history of dusky salamanders (*Desmognathus ocoee*): prey abundance and ecological limits

- on foraging time restrict opportunities for larval growth. *Journal of Zoology* (London), 259: 411-421.
- BERNAL, M. H. & CLAVIJO, J. A. 2009. An essay on precision in morphometric measurements in anurans: inter-individual, intra-individual and temporal comparisons. *Zootaxa*, 2246: 32-44.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K. & DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22 (3): 148-155.
- BIONDA, C. 2004. El canto de *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leptodactylidae) y su contexto ecológico. Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
- BIONDA, C.; SALAS, N. & DI TADA, I. 2006. Variación bioacústica en poblaciones de *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leptodactylidae) en Córdoba, Argentina. *Revista Española de Herpetología*, 20: 95-104.
- BIONDA, C.; SALAS, N. & DI TADA, I. 2008. Effect of temperature on the advertisement call of *Physalaemus bilingonigerus* (Anura: Leptodactylidae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 19-22.
- BLAIR, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American Naturalist*, 92: 27-51.
- BLAIR, W. F. 1964. Acoustic behaviour of amphibia. Pp 694-708, En: Bushmel, R.G. (ed.), *Acoustic Behaviour of Animals*. Elsevier, Amsterdam.
- BLOUIN, M. S. & BROWN, S. T. 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, 125: 358-361.
- BOSCH, J. & MÁRQUEZ, R. 1996. Discriminant functions for sex identification in two midwife toads (*Alytes obstetrizans* and *A. czsternasii*). *Herpetological Journal*, 6: 105-109.
- BOSCH, J., RAND, A. S. & RYAN, M. J. 2000. Signal variation and call preferences for the whine frequency in the tuñgara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49, 62-66.

- BOSCH, J. & DE LA RIVA, I. 2004. Are frog calls modulated by the environment? An analysis with anuran species from Bolivia. *Canadian Journal of Zoology*; 82, 6; Academic Research Library pp. 880.
- BOSCH, J. & MÁRQUEZ, R. 2000. Acoustical interference in the advertisement calls of the midwife toads (*Alytes obstetricans* and *Alytes cisternasii*). *Behaviour*, 137: 249-263.
- BOSCH, J. & MÁRQUEZ, R. 2005. Female Preference Intensities on Different Call Characteristics and Symmetry of Preference Above and Below the Mean in the Iberian Midwife Toad *Alytes cisternasii*. *Ethology*, 111: 323-333.
- BRENOWITZ, E. A. & ROSE, G. J. 1999. Female choice and plasticity of male calling behaviour in the Pacific treefrog. *Animal Behaviour*, 57:1337-1342.
- BRIDAROLLI, M. E. & DI TADA, I. E. 1994. Biogeografía de los Anfibios Anuros de la Región Central de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 8: 63-82.
- BRIDAROLLI, M. E. & DI TADA, I. E. 1996. Algunos aspectos de la geografía física de la provincia de Córdoba, pp. 15-38. En: di Tada & Bucher, E. H. (Eds.), *Biodiversidad de la provincia de Córdoba: Fauna. Vol I*.
- BROWN, A.; MARTINEZ ORTIZ, U.; ACERBI, M. & CORCHERA, J. (EDS.). 2006. *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- BRZOSKA, J.; SCHNEIDER, H. & NEVO, E. 1982. Territorial behavior and vocal response in male *Hyla arborea savignyi* (Amphibia: Anura). *Israel Journal of Zoology*, 31: 27-37.
- BURMEISTER, S.; WILCZYNSKI, W. & RYAN, M. J. 1999. Temporal call changes and prior experience affect graded signalling in the cricket frog. *Animal Behaviour*, 57: 611-618.
- BUSH, S. 1997. Vocal Behavior Males and Females en the Majorcan Miswife Toad. *Journal Herpetology*, 31: 251-257.
- BUSIN, C. S.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S. M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia-Anura). *Genetica*, 110: 131-141.
- BUSIN, C. S.; PIMENTEL LIMA, A; PERALTA DE ALMEIDA PRADO, C.; STRÜSSMANN, C; SIQUEIRA JÚNIOR, S. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2006. Chromosomal

differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus* and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). *Micron*, 37: 355-362.

- BUSIN C. S.; VASCONCELLOS ANDRADE, G.; BERTOLDO, J.; DEL GRANDE, M. L.; UETANABARO, M. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2008. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica*, 119-127.
- CAIRO, S. L. & DI TADA, I. E. 2005. Patrones de coloración de *Melanophryniscus sp.* (Anura: Bufonidae) en Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 16 (1-2): 44-49.
- CALVALCANTI, M. J. 2005. Mantel for windows, Version 1.18. Disponible en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- CAMP, C.; MARSHALL, J. L & AUSTIN, R. M. 2000. The evolution of adult body size in black-bellied salamanders (*Desmognathus quadramaculatus* complex). *Canadian Journal of Zoology*, 78:1712-1722.
- CAMPBELL, T. W. 2004. Hematology of Lower Vertebrates. American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA
- CAPITANELLI, R. G. 1979a. III. Clima. En: Geografía física de la Provincia de Córdoba Vázquez, J. B.; Miatello, R. A. & Roqué M. E. (Eds.). Ed. Boldt, Argentina.
- CAPITANELLI, R. G. 1979b. V. Geomorfología. En: Geografía física de la Provincia de Córdoba. Vázquez, J. B.; Miatello, R. A. & Roqué M. E. (Eds.). Ed. Boldt, Argentina.
- CASTELLANO, S.; GIACOMA, C.; DUJSEBAYEVA, T.; ODIERNA, G. & BALLETO, E. 1998. Morphometrical and acoustical comparison between diploid and tetraploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63: 257-281.
- CASTELLANO, S. & GIACOMA, C. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70: 341-360.
- CASTELLANO, S; GIACOMA, C & DUJSEBAYEVA, T. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploidy green toads. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70: 341-360.

- CEI, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano-Italian Journal of Zoology* 2, 609 pp.
- 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). *Comparative Hematology International*, 10: 19-29.
- COCROFT, R. B. & RYAN, M. J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*, 49: 283-303.
- COLLINS, J. P. & CRUMP, M. L. 2009. *Extinction in Our Times: Global Amphibian Decline*. Oxford University Press. Nueva York, EEUU. 304 pp.
- CÓRDOVA, J. H. 1999. On karyomorphs, cladistics and taxonomic status of the *Bufo spinulosus* species group (Amphibia: Anura) in Peru. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde. Serie A, Nr. 600*, 28 S.
- CRUMP, M. L. 1994. Climate and environmental, pp 42-46. En: Heyer, W. R.; Donnelly, M. A.; Mc Diarmid, R. W.; Hayek, L. C. & Foster, M. S. (eds.). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washigton, 364 pp.
- CUEVAS, C. C. & FORMAS, J. R. 2003. Cytogenetic analysis of four species of the genus *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus. *Hereditas*, 138: 138-147.
- DA CRUZ DE CAMPOS, J. R. & KASAHARA, S. 2006. Os cromossomos dos anfíbios anuros do gênero *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae: Eleutherodactylinae). *UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, Ponta Grossa, 12 (1): 27-38.
- DANDOVÁ, R.; WEIDINGER, K. & ZAVADIL, V. 1998. Morphometric variation, sexual size dimorphism and character scaling in a marginal population of Montandon's newt *Triturus montandoni* from the Czech Republic. *Italian Journal of Zoology*, 65: 399-405.
- DAVIES, H. G. 1961. Structure in Nucleated Erythrocytes. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9: 671-687.
- DAVIS, A. K. 2008. Ontogenetic changes in erythrocyte morphology in larval mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*, measured with image analysis. *Comparative Clinical Pathology*, 17:23-28.

- DAVIS, A. K.; MILANOVICH, J. R.; DEVORE J. L. & MAERZ, J. C. 2009. An investigation of factors influencing erythrocyte morphology of red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *Animal Biology* 59: 201-209.
- DE ANGELO, C. D. 2003. Variación Temporal de la Actividad Relativa de un Ensamble de Anuros. Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
- DE LA RIVA, I., KÖHLER, J., LÖTTERS, S. & REICHLER, S. 2000. Ten years of research on Bolivian amphibians: updated checklist, distribution, taxonomic problems, literature and iconography. *Revista Española de Herpetología*, 14: 19-164.
- DE QUEIROZ, A. & ASHTON, K. G. 2004. The phylogeny of a species-level tendency: species heritability and possible deep origins of Bergmann's rule in tetrapods. *Evolution*, 58(8): 1674-1684.
- 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 Zoologica et Pathologica Antverpiensia*, 76: 119-167.
- DICKERSON, M. C. 1986. "Vocalización", pp. 87-107. Duellman W. E. & L. Trueb. "Biología de Anfibios". McGraw Hill Inc., USA.
- DI TADA, I. E.; ZAVATTIERI, M. V. & MARTINO, A. L. 1996a. Análisis estructural del canto de *Hyla pulchella cordobae* (Amphibia: Hylidae) en la provincia de Córdoba (Argentina). *Revista Española de Herpetología*, 10: 7-11.
- DI TADA, I. E.; ZAVATTIERI, M. V.; SALAS, N. E. & MARTINO, A. L. 1996b. Anfibios Anuros de la provincia de Córdoba, pp. 191-215. En: di Tada I. E. y E. H. Bucher (eds). Biodiversidad de la provincia de Córdoba. Volumen I. Fauna. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- DI TADA, I. E. 1999. Patrones de distribución de los anfibios anuros de la provincia de Córdoba. Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, 155 pp.
- DOFFO, N. 1989. Geomorfología del área urbana de la ciudad de Río Cuarto y de la cuenca del arroyo El Bañado, algunas consideraciones aplicadas al manejo del medio natural. Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.

- DÖNMEZ, F.; TOSUNOĞL, M. & GÜL, Ç. 2009. Hematological values in hermaphrodite, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758). North-Western Journal of Zoology 5, (1): 97-103.
- DUELLMAN, W. E. & PYLES, R. 1983. Acoustic Resource Partitioning in Anuran Communities. Copeia, 3: 639-619.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. Biology of Amphibians. McGraw Hill Inc., USA.
- DUELLMAN, W. E.; DE LA RIVA, I. & WILD, E. R. 1997. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. Scientific Papers, Natural History Museum, The University of Kansas, 3:1-41.
- DURÉ, M.; SCHAEFER, E. F.2 & 1. KEHR, A. 2003. Descripción del canto de encuentro en *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactyli dae) de Corrientes, Argentina.
- ENDLER, J. A. & HOUDE, A. E. 1995. Geographic variation in female preferences for male traits in *Poecilia reticulata*. Evolution, 49: 456-468.
- FAIRBAIRN, D. J. 1997. Allometry for sexual size dimorphism: Pattern and process in the coevolution of body size in males and females. Annual Review of Ecology and Systematics, 28: 659-687. Cuadernos de Herpetología, 17 (1-2): 119-125.
- FABREZI, M. 2006. Morphological evolution of Ceratophryinae (Anura, Neobatrachia). Blackwell Verlag, Berlin: 1-14.
- FAIVOVICH, J. ; GARCÍA, P. C. A.; ANANIAS, F.; LANARI, L.; BASSO, N. G. & WHEELER, W. C. 2004. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 32: 938-950.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD C. F. B; GARCÍA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A. & WEELER, W. C. 2005. Systematic review of the frog Family Hylidae, with special reference to Hyliinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Boletín del American Museum of Natural History, New York, Número 294: 1-240.
- FORMAS, J. R. & CUEVAS, C. C. 2000. Comparative cytogenetics analysis of the Chilean leptodactylid frog genus *Telmatobufo*, with the description of the chromosomes of *T. venustus*. Proceedings of the Biological Society of Washington, 113: 890-899.
- FRIEDL, T. W. P. & KLUMP, G. M. 2005. Sexual selection in the lek-reeding European treefrog: body size, chorus attendance, random mating and good genes. Animal Behaviour, 70: 1141-1154.

- 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, 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.; DONNELAN, 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. & WHEELER, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1-370.
- FUNK, W. C.; ANGULO, A.; CALDWELL, J. P.; RYAN, M. J. & CANNATELLA, D. C. 2008. Comparison of morphology and calls of two cryptic species of *Pysalaemus* (Anura: Leiuperidae). *Herpetologica*, 64(3): 290-304.
- GALLARDO, J. M. 1974. Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires.
- GALLARDO, J. M. 1987. Anfibios Argentinos. Guía para su identificación. Biblioteca Mosaico, Lib. Agropecuaria, Buenos Aires, 98: 81-82.
- GARCIA, P. C. A.; VINCIPROVA, G. & HADDAD, C. F. B. 2003. The taxonomic status of *Hyla pulchella joaquina* (Anura: Hylidae) with description of its tadpole and vocalization. *Herpetologica*, 59(3): 350-363.
- GAO, Z.; WANG, W.; ABBAS, K.; ZHOU, X.; YANG, Y.; DIANA, J. S.; WANG, H.; WANG, H. LI, Y. & SUN, Y. 2007. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147: 1001-1008.
- GERHARDT, H. C. 1982. Sound pattern recognition in some North American treefrogs (Anura: Hylidae): implications for mate choice. *American Zoologist*, 22:581-595.
- GERHARDT, H. C. 1991. Female mate choice in tree frogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42: 615-635.
- GERHARDT, H. C. 1994. The Evolution of Vocalization in Frogs and Toads. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 293-324.
- GERHARDT, H. C. & BEE, M. A. 2007. Recognition and localization of acoustic signals. In: *Hearing and Sound Communication in Amphibians* (Narins, P. M., Feng, A. S., Fay, R. R. & Popper, A. N., eds). Springer, New York, pp. 113-146.

- GERHARDT, H. C. & HUBER, F. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions. Chicago University Press, Chicago.
- GOULD, S. J. & JOHNSTON, R. F. 1972. Geographic Variation. Annual Review of Ecology and Systematics, 3: 457-498.
- GREEN, D. M. & SESSIONS, S. K. 1991. Nomenclature for chromosomes. Pp. 341–432. En: Green, D. M. & Sessions, S. K. (Eds.): Amphibian cytogenetics and evolution. 456 pp., New York (Academic Press Inc).
- GREGORY, T. R. 2000. Nucleotypic effects without nuclei: Genome size and erythrocyte size in mammals. Genome, 43: 895-901.
- GREGORY, T. R. 2001. The Bigger the C-Value, the Larger the Cell: Genome Size and Red Blood Cell Size in Vertebrates. Blood Cells, Molecules and Diseases, 27(5): 830–843.
- GRENAT, P. R. 2006. Identificación geográfica de zonas híbridas y determinación de diferencias interespecíficas de poblaciones diplo/tetraploides de *Odontophrynus cordobae* y *Odontophrynus amaricanus*. Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
- GRENAT, P. R.; BIONDA, C. L.; SALAS, N. E. & MARTINO, A. L. 2009a. Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*. Amphibia-Reptilia, 30: 141-145.
- GRENAT, P. R.; SALAS, N. E. & 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.
- GUIMARÃES, L. D. & BASTOS, R. P. 2003. Vocalizações e interações acústicas em *Hyla raniceps* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. Iheringia, Série Zoológica, 93: 149-158.
- HADEN, R. L. 1940. Factors affecting the size and shape of the red cell, p. 27-33. En: Blood, heart and circulation, Moulton, F.R. (Ed.) A.A.A. S. Pub. N°13. Science Press. Lancaster, Pa.
- HALLIDAY, T. 2005. Diverse Phenomena Influencing Amphibian Population Declines. En: Lannoo, M. (ed), Amphibian Declines. The Conservation Status of United

States Species. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.

HARRIS, J. 1963. The red cell. Harvard University Press. Cambridge, Mass

HARTMAN, F. A. & LESSLER, M. A. 1964. Erythrocyte measurements in fishes, amphibia, and reptiles. *Biological Bulletin*, 126: 83-88.

HASEGAWA, Y.; UEDA, H. & SUMIDA, M. 1999. Clinal geographic variation in the advertisement call of the wrinkled frog, *Rana rugosa*. *Herpetologica*, 55: 318-324.

HEYER, W. R. 1994. Variation within the *Leptodactylus podicipinus-wagneri* complex of frogs (Amphibia: Leptodactylidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 546: 1-124

HEYER, W. R.; RAND, A. S.; GONÇALVES DA CRUZ, C. A.; PEIXOTO, O. L. & NELSON, C. E. 1990. Frogs of Boracéia. *Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 331 (4): 410.

HEYER, W. R. & 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)? *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 75(1): 39-54.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S; LARSON, A.; I'ANSON, H. & EISENHOUR, D. J. 2007. *Integrated Principles of Zoology*. 14th edition, McGraw Hill (pubs), Florida.

HILLIS, D. M. 1991. The phylogeny of amphibians: current knowledge and the role of cytogenetics, pp 7-31. En: Green D.M. & Sessions S. K. (eds), *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press.

HORNER, H. A. & MACGREGOR, H. C. 1983. C-value and cell volume: their significance in the evolution and development of amphibians. *Journal of Cell Science*, 63: 135-146.

KANAMADI, R. D.; HIREMATH, C. R. & SCHNEIDER, H. 1994. Advertisement calls of two anuran amphibians, *Rana tigrina* and *Tomopterna breviceps*. *Journal of Biosciences*, 19 (1): 75-80.

KANAMADI, R. D.; KADADEVARU, G. G. & SCHNEIDER, H. 2002. Advertisement Call and Breeding Period of the Frog, *Kaloula pulchra* (Microhylidae). *Herpetological Review*, 33(1): 19-21.

- KATSIKAROS, K. & SHINE, R. 1997. Sexual dimorphism in the tusked frog, *Adelotus brevis* (Anura: Myobatrachidae): the roles of natural and sexual selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60: 39-51.
- KING, M. 1990. *Animal Cytogenetics*. Vol. 4: Chordata 2. Amphibia. Gerbrüder Borntraeger berlin Stuttgart, 17-19 pp.
- KÖHLER, J. & LÖTTERS, S. 1998. Advertisement calls of two Bolivian *Leptodactylus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia*, 20: 215-219.
- KÖHLER, J.; KOSCINSKI, D.; PADIAL, J. M.; CHAPARRO, J. C.; HANDFORD, P.; LOUGHEED S. C. & DE LA RIVA, I. 2010. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). *Zoologica Scripta*, 39: 572-590.
- KOSCINSKI, D.; HANDFORD, P.; TUBARO, P. L.; SHARP, S. & LOUGHEED, S. C. 2008. Pleistocene climatic cycling and diversification of the Andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. *Molecular Ecology*, 10:1-14.
- KWET, A.; AQUINO, L.; LAVILLA, E. & DI TADA, I. 2004. *Hypsiboas pulchellus*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Se accedió el 10 de Diciembre de 2011.
- LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA, M.; PELTZER, P. M.; STRINGHINIC, G. A. & ATTADAMO, A. M. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2): 67-72.
- LAUGEN, A. T.; LAURILLA, A. & MERILÄ, J. 2002. Maternal and genetic contributions to geographical variation in *Rana temporaria* larval life-history traits. *Biological Journal of the Linnean Society*, 76: 61-70.
- LANDE, R. 1982. Rapid origin of sexual isolation and character divergence in a cline. *Evolution*, 36: 213-223.
- LANGONE J. A. & LAVILLA E. O. 2002. Comentarios nomenclatoriales sobre algunos taxa del grupo de *Hyla pulchella* (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 16 (1): 73-78.
- LAVILLA, E. O. 1984; Redescrición de larvas de *Hyla pulchella andina* (Anura, Hylidae) con un análisis de la variabilidad interpoblacional. *Neotrópica*, 30(83): 19-30.

- LAVILLA, E. O. & FABREZI, M. 1987. Anatomía de larvas de *Hyla pulchella andina* (Anura, Hylidae). *Phycis*, 45(109): 77-82.
- LEHR, E.; FAIVOVICH, J. & JUNGFER, K. H. 2010. A new Andean species of the *Hypsiboas pulchellus* group: adults, calls and phylogenetic relationships. *Herpetologica*, 66: 296-307.
- LEHR, E.; FAIVOVICH, J. & JUNGFER, K. H. 2011. Description of the tadpoles of *Hypsiboas aguilari* and *H. melanopleura* (Anura: Hylidae: *Hypsiboas pulchellus* group). *Salamandra*, 47: 30-35.
- LEVAN, A., FREGA, K., SANDBERG, A. 1964. Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- LEWIS, J. P.; PRADO, D. E. & BARBERIS, I. M. 2006. En: Brown, A.; Martinez Ortiz, U.; Acerbi, M. & Corchera, J. (Eds.). *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- LIPS, K. R.; REASER, J. K.; YOUNG, B. E. & IBÁÑEZ, R. 2001. Amphibian monitoring in Latin America: a protocol manual. *Herpetological Circulars*, 30: 1-116.
- LOBO, F. 2001. A phylogenetic analysis of lizards of the *Liolaemus chilensis* group (Iguania: Tropiduridae). *Herpetological Journal*, 11(4): 137-150.
- LOBO, F. & ABDALA, C. 2001. Variación morfológica en el esqueleto de *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae). Búsqueda y descripción de caracteres. *Cuadernos de Herpetología*, 15(2): 119-135.
- LOURENÇO, L. B.; NASCIMENTO, J. A. A.; ANDRADE, G. V.; ROSSA-FERES, D. C. & RECCO-PIMENTEL, S. M. 2006. Chromosomal analysis of the leptodactylids *Pleurodema diplolistris* and *Physalaemus nattereri* (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, 27: 481-489.
- LOURENÇO, L. B.; BACCI-JÚNIOR, M.; MARTINS, V. G.; RECCO-PIMENTEL, S. M. & HADDAD, C. F. B. 2008. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132: 255-266.
- LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. 1999. Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Canadian Journal of Zoology*, 77: 624-631.

- LOURENÇO, L. B.; BACCI-JÚNIOR, M.; MARTINS, V. G.; RECCO-PIMENTEL, S. M. & HADDAD, C. F. B. 2008. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132: 255-266.
- LUTI, R.; BERTRAN DE SOLIS, M. A.; GALERA, M. F.; MÜLLER DE FERREIRA, N.; BERZAL, M.; NORES, M.; HERRARA, M. A. & BARRERA, J. C. 1979. Vegetación. En: Geografía física de la Provincia de Córdoba (Vázquez, J. B.; Miatello, R. A. & Roqué M. E. (Eds.). Ed. Boldt, Argentina.
- LUTZ, B. 1968. New Brazilian forms of *Hyla*. Pearce-Sellards Ser. 3-18.
- LUTZ, B. 1973. Brazilian Species of *Hyla*. University of Texas Press, Austin.
- MANEYRO, R. & ARRIETA, D. 2000. Reporte de variaciones morfológicas en ejemplares de *Bufo arenarum* Hensel 1867, con comentarios sobre el grupo *Marinus*. Boletín Sociedad Zoológica del Uruguay, 12: 1-13.
- MÁRQUEZ, R.; DE LA RIVA, I. & BOSCH, J. 1993. Advertisement Calls of Bolivian Species of *Hyla* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Biotropica*, 25: 426-443.
- MÁRQUEZ, R. 1995. Preferencias de las hembras por cantos de frecuencia dominante baja en el sapo partero común *Alytes obstetricans* (Anura, Discoglossidae). Experimentos *in situ*. *Revista Española de Herpetología*, 9: 77-83.
- MÁRQUEZ, R. & BOSCH, J. 2003. Temporal encoding of information in the advertisementcall of the Iberian midwife toad (*Alytes cisternasii*). The importance of rise time. *Behaviour*, 140: 113-123.
- MÁRQUEZ, R.; MOREIRA, C.; DO AMARAL, J. P. S.; PARGANA, J. M. & CRESPO, E. G. 2005a. Sound pressure level of advertisement calls of *Hyla meridionalis* and *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia*, 26: 391-395.
- MÁRQUEZ, R., PENNA, M.; MARQUES, P. & DO AMARAL J. P. S. 2005b: Diverse types of advertisement calls in the frogs *Eupsophus calcaratus* and *E. roseus* (Leptodactylidae). A Quantitative Comparison. *Herpetological Journal*, 15: 257-263.
- MARTÍNEZ, F. J.; MENDIOLA, P. & DE COSTA, J. 1985. Parámetros hematológicos de *Rana perezii* (Amphibia: Salientia). *Anales de Biología*, 5 (Biología General, 1): 73-78.

- MARTINO, A. L. & SINSCH, U. 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *Journal of Zoology*, The Zoological Society of London, Cambridge University Press. 257: 67-81.
- MARTORI, R. & AVILA, L. J. 1992. Confirmación de la Presencia de *Hyla pulchella pulchella* para la Provincia de Córdoba (Argentina). *Boletín Asociación Herpetológica Argentina*, Vol. 8, N° 1: 4-5.
- MATSON, T. O. 1990. Erythrocyte size as a taxonomic character in the identification of Ohio *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Herpetologica*, 46(4): 457-462.
- MAYR, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- MCCLELLAND, B. E.; WILCZYNSKI, W. & RYAN, M. J. 1996. Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *The Journal of Experimental Biology*, 199: 1907-1919.
- MÉNDEZ, M. A.; SOTO, E. R.; CORREA, C.; VELOSO, A.; VERGARA, E.; SALLABERRY, M. & ITURRA, P. 2004. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 77: 559-567.
- MIAUD, C. & MERILÄ, J. 2001. Local adaptation or environmental induction? Causes of population differentiation in alpine amphibians. *Biota*, 2: 31-50.
- MIURA I 1995. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosomes. *Caryologia*, 48:123-136.
- MORESCALCHI, A. 1973. Amphibia, pp. 233-348. En: Chiarelli A.B. & Campanna E. (eds), *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, London, United Kingdom.
- MORESCALCHI, A. 1990. Cytogenetics and the problem of Lissamphibian relationships. En: Olmo, E. eds. *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhäuser Verlag Berlin, pp.1-19.
- MOYE, R. J. JR.; WASHBURN, K. W. & MUSTON, T. M. 1969. Effects of environmental temperature on erythrocyte numbers and size. *Poult. Sci.*, 48(5): 1683-1686.

- MUNIZ, K. P. R.; GIARETTA, A. A.; SILVA, W. R. & FACURE, K. G. 2008. Auto-ecología de *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) em área de Cerrado no sudeste do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 98(2):254-259.
- MURPHY, J. E.; PHILLIPS, C. A. & BEASLEY, V. R. 2000. Aspects of amphibian ecology. En: *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, ed. Sparling, D. W.; Linder, G. & Bishop, C. A. 141-78. Pensavola, FL: SETAC Press.
- NATALE, E. S. 1999. Status de Conservación de Especies Vegetales que Ocurren en la Sierras de Comechingones. Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
- NARINS, P. M., & SMITH, S. L. 1986. Clinal variation in anuran advertisement calls: basis for acoustic isolation? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19:135-141.
- NEVO, E. 1972. Climatic adaptation in size of the green toad. *Israel Journal of Medical Sciences* 1972:1010.
- NEVO, E. & CAPRANICA, R. R. 1985. Evolutionary origin of ethological reproductive isolation in cricket frogs, *Acris*. *Evolutionary Biology*, 19:147-214.
- NÖLLER, H. G. 1959. Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 269: 98-100.
- OLIVER, I. M. & LOBO, F. 2002. Una nueva especie de *Liolaemus* del grupo alticolor (Iguania: Liolaemidae) de la Puna salteña, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 16(1): 47-64.
- OLMO, E. & MORESCALCHI, A. 1975. Evolution of the genome and cell sizes in salamanders. *Experientia*, 31: 804-806.
- PARGANA, J. M.; MÁRQUEZ, R.; REUQUES, R.; SÁNCHEZ-HERRAIZ, M. J.; TEJEDO, M. & CRESPO, E. G. 2003. The Mating Call Of *Pelodytes ibericus* (Anura, Pelodytidae). *Herpetología*, 13: 199-204.
- PENNA, M. & VELOSO, A. 1987. Vocalization by andean frogs of the genus *Telmatobius* (Leptodactylidae). *Herpetología*, 43: 208-216.
- PRÖHL, H; HAGEMANN, S.; KARSCH, J. & HÖBEL, G. 2007. Geographic Variation in Male Sexual Signals in Strawberry Poison Frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology*, 113: 825-837.
- PLATZ, J. E. 1988. Geographic variation in mating call among the four subspecies of the chorus frog: *Pseudacris triseriata*. *Copeia*, 1988: 1062-1066.

- POL, R. G.; CAMÍN, S. R. & ASTIÉ, A. A. 2006. La Situación Ambiental en la Ecoregión del Monte. En: Brown, A.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M. & Corchera, J. (Eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- POMBAL, J. P. & BASTOS, R. P. 2003. Vocalizações de *Scinax perpusillus* (A. Lutz & B. Lutz) e *S. arduous* Peixoto (Anura, Hylidae), com comentários taxonômicos. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20 (4): 607-610.
- PRÖHL, H.; HAGEMANN, S.; KARSCH, J. & HÖBEL, G. 2007. Geographic Variation in Male Sexual Signals in Strawberry Poison Frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology*, 113:825-837.
- PRAMUK, J. B. 2006. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146: 407-452.
- REAL, R. & ANTUNEZ, A. 1991. Análisis e interpretación de las dimorfometrías de una población de *Rana perezii*. *Anales de Biología*, 17 (Biología Animal, 6): 63-69.
- REBORATTI, C. 2006. La Situación Ambiental en las Ecoregiones Puna y Altos. En: Brown, A.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M. & Corchera, J. (Eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- RODRIGUEZ PIAZZE, M. E. 1995. Cariotipo y patrones de bandas C en *Bufo spinulosus arequipensis* (Amphibia, Anura). *Revista de Ecología Latinoamericana*, 2: 05-11.
- ROSSO, A.; CASTELLANO, S. & GIACOMA, C. 2004. Ecogeographic analysis of morphological and life-history variation in the Italian frog. *Evolutionary Ecology Research*, 18: 303-321.
- RUIZ, G.; ROSENMANN, M. & VELOSO, A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 94 (4): 643-646.
- RUIZ, G.; ROSENMANN, M. & NUNEZ, H. 1993. Blood values in South American lizards from high and low altitudes. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 106, 713-718.
- RYAN, M. J. 1985. The Túngara Frog. A Study in Sexual Selection and Communication. University of Chicago Press, Chicago.

- RYAN, M. J. & SULLIVAN, B. K. 1989. Transmission effects on temporal structure in the advertisement calls of two toads, *Bufo woodhouseii* and *Bufo valliceps*. *Ethology*, 80: 182-189.
- RYAN, M. J. & 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.; RAND, A. S. & WEIGT, L. A. 1996. Allozyme and advertisement call variation in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution*, 50:2435-2453.
- SALAS, N. E.; ZAVATTIERI, M. V.; DI TADA, I. E.; MARTINO, A. L. & BRIDAROLLI, M. E. 1998. Bioacustical and Etho-Ecological Features in Amphibian Communities of Southern Córdoba Province (Argentina). *Cuaderno Herpetológico*, 12: 37-46.
- SALAS, N. E. 2004. Las especies del género *Odontophrynus* de la provincia de Córdoba, Argentina. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- 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*, 20:31-38.
- SCHÄUBLE, C. S. 2004. Variation in body size and sexual dimorphism across geographical and environmental space in the frogs *Limnodynastes tasmaniensis* and *L. peronii*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 39-56.
- SCHNEIDER, H.; SINSCH, U. & SOFIANIDOU, T. S. 1993. The water frog of Greece. Bioacoustic evidence for a new species. *Zeitschrift fuer zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 31: 47-63.
- SCHNEIDER, H. & STEINWARZ, D. 1990. Mating and territorial calls of the Spanish lake frog *Rana perizi* (Ranidae: Amphibia). *Zoologische Anzeiger*, 225: 265-277.
- SCHMID, M. 1978a. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66:381-388.
- SCHMID, M. 1978b. Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, 68: 131-148.

- SCHMID, M.; OLERT, J. & KLETT, C. 1979. Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma*, 71: 29-55.
- SCHMID, M.; STEINLEY, C.; NANDA, I. & EPPLER, J. T. 1990. Chromosome banding in Amphibia, pp. 21–45. En: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*, edited by E. Olmo. Birkhäuser Verlag, Basel.
- SCHNEIDER, H. & SINSCH, U. 1992. Mating call variation in lake frogs referred to as *Rana ridibunda* Pallas, 1771. *Zeitschrift fuer zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 30: 297-315.
- SCHNEIDER, H.; SINSCH, U. & SOFIANIDOU, T. S. 1993. The water frog of Greece. Bioacoustic evidence for a new species. *Zeitschrift Fur Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*, 31:47-63.
- SCHRÖER, T. & GREVEN, H. 1998. Verbreitung, Populations strukturen und ploidi grade von Wasserfröschen in Westfalen. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 5: 1-14.
- SCHWARTZ, J. J. & WELLS, K. D. 1985. Intra-and interspecific vocal behavior of the neotropical treefrog *Hyla microcephala*. *Copeia*, 1985: 27-28.
- SCHWARTZ, J. J. 1989. Graded aggressive calls of the spring peeper, *Pseudacris crucifer*. *Herpetológica*, 45: 172-181.
- SCHWARTZ, J. J.; BUCHANAN, B.W. & GERHARDT, H. C. 2002. Acoustic interactions among male gray treefrogs, *Hyla versicolor*, in a chorus setting. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 53:9–19.
- SCOTT, E. 2005. A phylogeny of ranid frogs (Anura: Ranoidea: Ranidae), based on a simultaneous analysis of morphological and molecular data. *Cladistics*, 21: 507-574.
- SCROGGIE, M. P. & LITTLEJOHN, M. J. 2005. Territorial vocal behavior in hybrid smooth froglets, *Geocrinia laevis* complex (Anura: Myobatrachidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58: 72-79.
- SEPPÄ, P. & LAURILA, A. 1999. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity*, 82:309-317.
- SESSION, S. 1996. Chromosomes: Molecular Cytogenetics, pp. 121-168. En: D. M. Hillis, C. Moritz, B. K. mable (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A. pp.665.

- SEVINÇ, M.; UGURTAS, I. H. & YILDIRIMHAN, H. S. 2000. Erythrocyte Measurements in *Lacerta rudis* (Reptilia, Lacertidae). Turkish Journal of Zoology, 24: 207-209.
- SHINE, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. Copeia, 2: 297-306.
- SILVA-FILHO, I. S. N. & JUNCÁ, F. A. 2006. Evidence of full species status of the neotropical leaf-frog *Phyllomedusa burmeisteri bahiana* (A. Lutz, 1925) (Amphibia, Anura, Hylidae). Zootaxa, 1113: 51-64.
- SINSCH, U. & 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.; SCHNEIDER, H.; KAYA, U. & ARIKAN, H. 2002. The water frogs (Anura: Ranidae) of Turkey: a morphometric view on systematics. Herpetological Journal, 12: 141-153.
- SMITH, M. J. & ROBERTS, J. D. 2003a. Call structure may affect male mating success in the quacking frog *Crinia georgiana* (Anura: Myobatrachidae). Behavioral Ecology and Sociobiology, 53:221-226.
- SMITH, M. J.; ROBERTS, J. D.; HAMMOND, T. J. & DAVIS, R. A. 2003b. Intraspecific Variation in the Advertisement Call of the Sunset Frog *Spicospina flammocaerulea* (Anura: Myobatrachidae): A Frog with a Limited Geographic Distribution. Journal of Herpetology, 37(2): 285-291.
- SMITH, M. J.; OSBORNE, W. & HUNTER, D. 2003c. Geographic Variation in the Advertisement Call Structure of *Litoria verreauxii* (Anura: Hylidae). Copeia, 4: 750-758.
- SMITH, M. J. & HUNTER, D. 2005. Temporal and geographic variation in the advertisement call of the booroolong frog (*Litoria booroolongensis*: Anura: Hylidae). Ethology 111, 1103-1115.
- SMOUSE, P. E.; LONG, J. C. & SOKAL, R. R. 1986. Multiple regression and correlational extensions of the Mantel test of matrix correspondence. Systematic Zoology, 35: 627-632.
- STÖCK, M & GROSE, W. R. 1997. Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. Alytes, 15: (2): 72-90.

- STUART, S. 2006. *Hypsiboas cordobae*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Se accedió el 10 de diciembre de 2011.
- SULLIVAN, B. K.; MALMOS, K. B. & GIVEN, M. F. 1996. Systematics of the *Bufo woodhousii* complex (Anura: Bufonidae): advertisement call variation. *Copeia*, 1996: 274-280.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- SUN, J. W. C. & NARINS, P. M. 2005. Anthropogenic sounds differentially affect amphibian call rate. *Biological Conservation*, 121:419-427.
- TORRELLA, S. A. & ADÁMOLI, J. 2006. Situación Ambiental de la Ecoregión del Chaco Seco. En: Brown, A.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M. & Corchera, J. (Eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- UZZELL, T. 1964. Relations of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex (Amphibia, Caudata). *Copeia*, 257-300.
- VALETTI, J. A. 2003. Monitoreo Acústico de una Comunidad de Anfibios en una Reserva Natural (Alejandro Roca, Córdoba, Argentina). Trabajo Final de Licenciatura. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales.
- VALETTI, J. A.; SALAS, N. E. & 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.
- VASARA, E., SOFIANIDOU, T. S. & SCHNEIDER, H. 1991. Bioacoustic Analysis of the Yellow-bellied Toad in Northern Greece (*Bombina variegata scabra* L., Anura, Discoglossidae). *Zoologischer Anzeiger*, 226: 220-236.
- VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; Lima, A. P. & Recco-Pimentel, S. M. 2003. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura–Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas*, 139: 189-198

- VENCES, M. & WAKE, D. 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. En: H. Heatwole (Ed.) *Amphibian Biology*, 7: 2613-2671. Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons.
- VITT, L. J.; CALDWELL, J. P.; WILBUR, H. M. & SMITH, D. C. 1990. Amphibians as harbingers of decay. *BioScience*, 40:418.
- VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. 2009. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Third Edition. Burlington, Massachusetts, U.S.A.: Academic Press.
- VÖRÖS, J.; ALCOBENDAS, M.; MARTÍNEZ-SOLANO, I. & GARCÍA-PARÍS, M. 2006. Evolution of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Anura: Discoglossidae) in the Carpathian Basin: A history of repeated mt-DNA introgression across species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38: 705-718.
- WEBER, R. E. 2007. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 158: 132-142.
- WELLS, K. D. 1977. Territoriality and male mating success in the green frog (*Rana clamitans*). *Ecology*, 58: 750-762.
- WELLS, K. D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- WEST-EBERHARDT, M. J. 1983. Sexual selection, social competition, and speciation. *The Quarterly Review of Biology*, 58: 973-993.
- WHITAKER, B. R. 2001. Chapter 22 Reproduction. In: Wright, K. M. & Whitaker, B. R. (eds.) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida.
- WIENS, J. J.; FETZNER JR, J. W.; PARKINSON, C. L. & REEDER, T. W. 2005. Hylid Frog Phylogeny and Sampling Strategies for Speciose Clades. *Systematic Biology*, 54(5):719-748.
- WIENS, J. J.; GRAHAM, C. H.; MOEN, D. S.; SMITH, S. A. & REEDER, T. W. 2006. Evolutionary and ecological causes of the latitudinal diversity gradient in hylid frogs: treefrog trees unearth the roots of high tropical diversity. *The American Naturalist*, 168: 579-596.

Análisis bioacústico y morfométrico de las especies del grupo *pulchella* (Género: *Hypsiboas*, Familia Hylidae, Anura) en la región central de Argentina

- WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; HUA, X. & MOEN, D. S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 871-882.
- WITTE, K.; RYAN, M. J. & WILCZYNSKI, W. 2001. Changes in the Frequency Structure of a Mating Call Decrease its Attractiveness to Females in the Cricket Frog *Acris crepitans blanchardi*. *Ethology*, 107:685-699.
- WOJTASZEK, J. & ADAMOWICZ, A. 2003. Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Comparative Clinical Pathology*, 12: 129-134.
- WRIGHT, K. M. 2001. Evolution of the amphibia. En: *Amphibian medicine* Edited by Wright, K. M. & Whitaker, B. R. (Eds), Krieger Publishing Company Malabar, Florida.
- WYCHERLEY, J.; DORAN, S. & BEEBEE, T. J. C. 2002. Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77: 355-365.
- ZAMPIERI SILVA, A. P.; HADDAD, C. F. B.; GALASSI, G. G. & KASAHARA, S. 2006. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica*, 127: 35-44
- ZHELEV, Z. M.; ANGELOV, M. V. & MOLLOV, I. A. 2006. A Study of Some Metric Parameters of the Erythrocytes in *Rana ridibunda* (Amphibia: Anura) Derived from an Area of Highly Developed Chemical Industry. *Acta Zoologica Bulgarica*, 58 (2): 235-244.
- ZUG, G.; VITT, J. L. & CALDWELL, J. P. 2001. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press. San Diego, California, USA.



U.N.R.L.
Biblioteca Central



71212

71212