



71259



Tesis Doctoral



Doctorado en Ciencias Biológicas

**Biodiversidad del género *Pleurodema* en el área central
de Argentina y análisis comparativo de los diferentes
taxa mediante el uso de caracteres morfológicos,
celulares y etológicos**

Licenciado Julián A. Valetti

Director: Dr. Adolfo L. Martino

Co-Director: Dr. Ismael E. di Tada

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

Marzo 2012



Biodiversidad del género *Pleurodema* en el área central de
Argentina y análisis comparativo de los diferentes *taxa*
mediante el uso de caracteres morfológicos, celulares y
etológicos

TRABAJO DE TESIS PARA ACCEDER AL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES


Doctorando: Lic. Julián A. Valetti


Director: Dr. Adolfo L. Martino

Co-Director: Dr. Ismael E. di Tada

Miembros de la Comisión Asesora y Jurado de Tesis:

Dr. Néstor Basso (CENPAT, Puerto Madryn) 

Dr. Arturo Kehr (CECOAL, Corrientes) 

Dr. Hugo Varela (UNRC, Río Cuarto) 



A Anita, Abril y Lauti, mi Norte!



AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral requirió de un gran esfuerzo personal e individual. Sin embargo, la concreción de la misma no hubiese sido posible sin la ayuda y apoyo de una gran cantidad de personas. Es por ello que quiero agradecerles a todos ellos el haber estado a mi lado y empujado hacia adelante cuando lo necesité y también quiero reconocer y valorar lo que cada uno aportó, desde sus diferentes roles, para que hoy alcance la meta propuesta hace unos años atrás.

Quiero expresar un muy sincero agradecimiento al Dr. Adolfo Martino, mi director de tesis. Por un lado porque como doctorando pude trabajar desde la elaboración inicial del proyecto hasta el punto final del manuscrito, enriqueciendo el trabajo realizado mediante charlas y discusiones, pero además tuve siempre un oído dispuesto a escucharme cuando algún tema extracurricular surgía.

Al Dr. Ismael di Tada le agradezco por haber sido mi director en la tesina de grado y así brindarme su conocimiento y pasión por estos menospreciados anfibios y por co-dirigirme en esta tesis doctoral.

También tengo un profundo agradecimiento hacia todos los integrantes de la orientación donde trabajo, Nancy Salas, Pablo Grenat, Mariana Baraquet, Clarisa Bionda y Ana Laura Correa. Junto a ellos compartí tareas de docencia e investigación y de cada uno pude aprender cosas muy importantes, como esfuerzo, trabajo, dedicación, entrega... Muchas gracias!

Reconozco y agradezco a los Dres. Hugo Varela, Néstor Basso y Arturo Kehr, los integrantes de mi Comisión Asesora de tesis y Jurado evaluador, porque con sus aportes y sugerencias pude ir encaminando mi tesis.



Obviamente que les debo muchísimo a otras personas que siendo “ajenas” en la parte formal de mi formación doctoral, jamás estuvieron ausentes. En primer lugar debo agradecer a Meli, mi amor. Ella me demostró que con esfuerzo, amor y perseverancia se pueden alcanzar las metas propuestas. Gracias por dejar que todos los días podamos juntos pensar en un futuro prometedor y feliz. También a ella, junto a mis pequeños amores Anita, Abril y Lauti, debo pedirle disculpas por el tiempo “no dedicado” y por mis locuras incomprensibles por ellos, perdón!!!

En este acompañamiento también estuvieron muy presentes mi Madre y mis hermanos. Quizás geográficamente más distante de lo que hubiésemos querido, pero siempre cerca mediante sus afectos, apoyo y comprensión. Gracias por bancarme y aceptar mis decisiones. Los quiero mucho!!!

No puedo dejar de reconocer y agradecer a todos los compañeros de vida que me acompañaron en las diferentes campañas de muestreos, compartiendo no solo la aventura de pasar noches completas bajo los cielos de diferentes lugares realizando los muestreos de mis “Pleurodemas”, sino también disfrutando de recorrer diferentes sitios, observando la flora y la fauna de variados ambientes o de simplemente estar “biologando” por ahí. Ellos fueron Los Pablos, Migue, Javi, el Turko, Mariana, Meli, Adolfo, Manu, y algunos más que se sumaron!!!

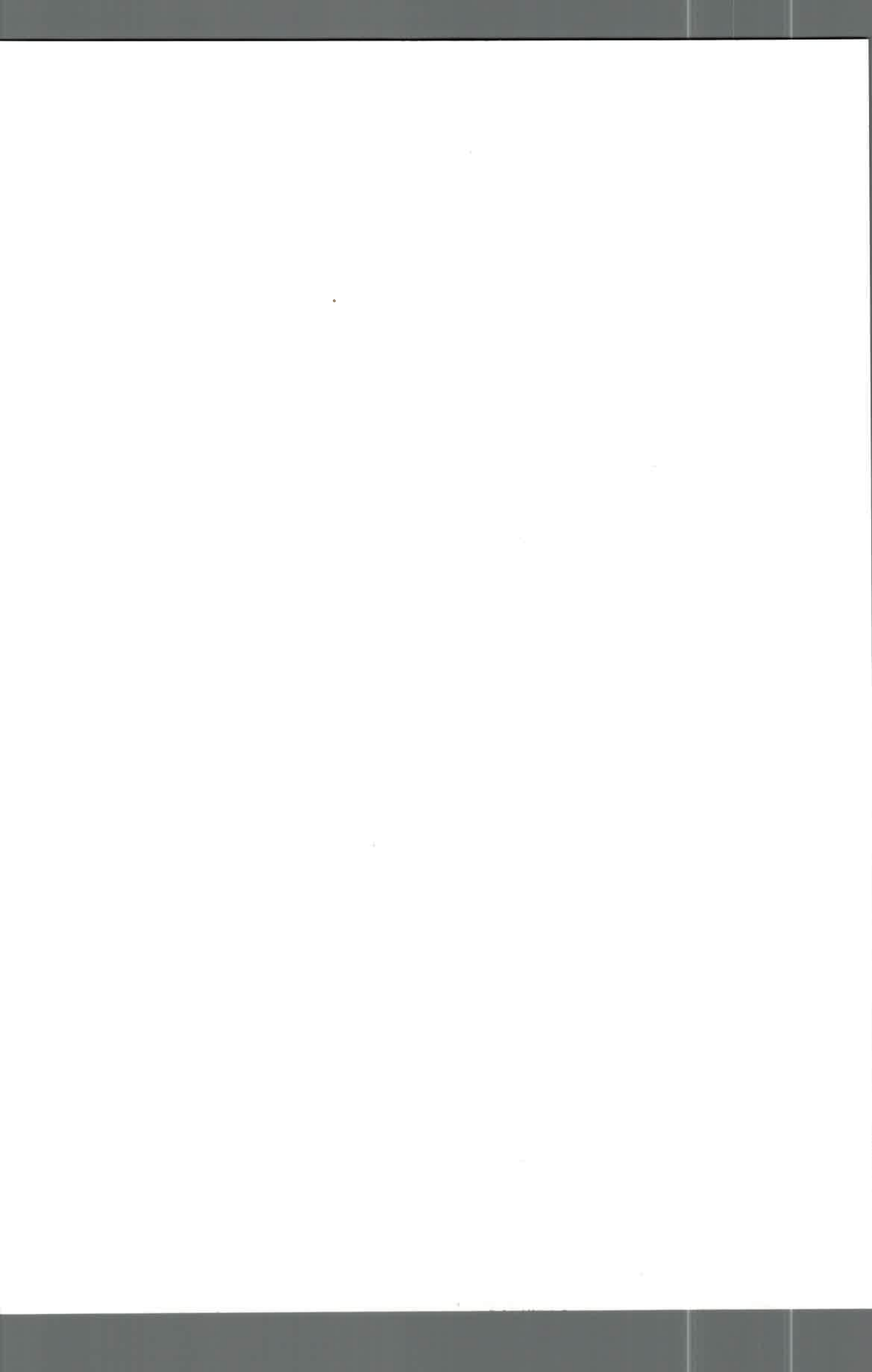
Agradezco a la Universidad Nacional de Río Cuarto por permitirme desarrollar mi carrera de cuarto nivel en esta casa de altos estudios y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), quien con la beca de posgrado Tipo I ha permitido que desarrolle las tareas correspondientes a mi tesis doctoral.

Por último quiero agradecer a todas aquellas personas, que no podría enumerar por la gran cantidad resultante, que me ayudaron a crecer, madurar y valorar la vida. A todos aquellos que se identifican, **Muchísimas gracias!!!**



ÍNDICE DE CONTENIDOS

<u>Resumen</u>	I
<u>Abstract</u>	II
<u>Introducción general</u>	1
Hipótesis	6
Objetivos	7
<u>Capítulo I: Área de estudio</u>	8
Sector 1: Espinal en ecotono con la Llanura Pampeana	13
Sector 2: Chaco Árido	13
Sector 3: Chaco Serrano	16
Sector 4: Chaco Árido en ecotono con el Monte	18
<u>Capítulo II: Aspectos celulares y moleculares de las</u>	
<u>Especies del género <i>Pleurodema</i> del área central</u>	
<u>de Argentina: Citogenética y Eritrometría</u>	20
Introducción	20
Materiales y Métodos	23
<i>Citogenética</i>	23
<i>Eritrometría</i>	25



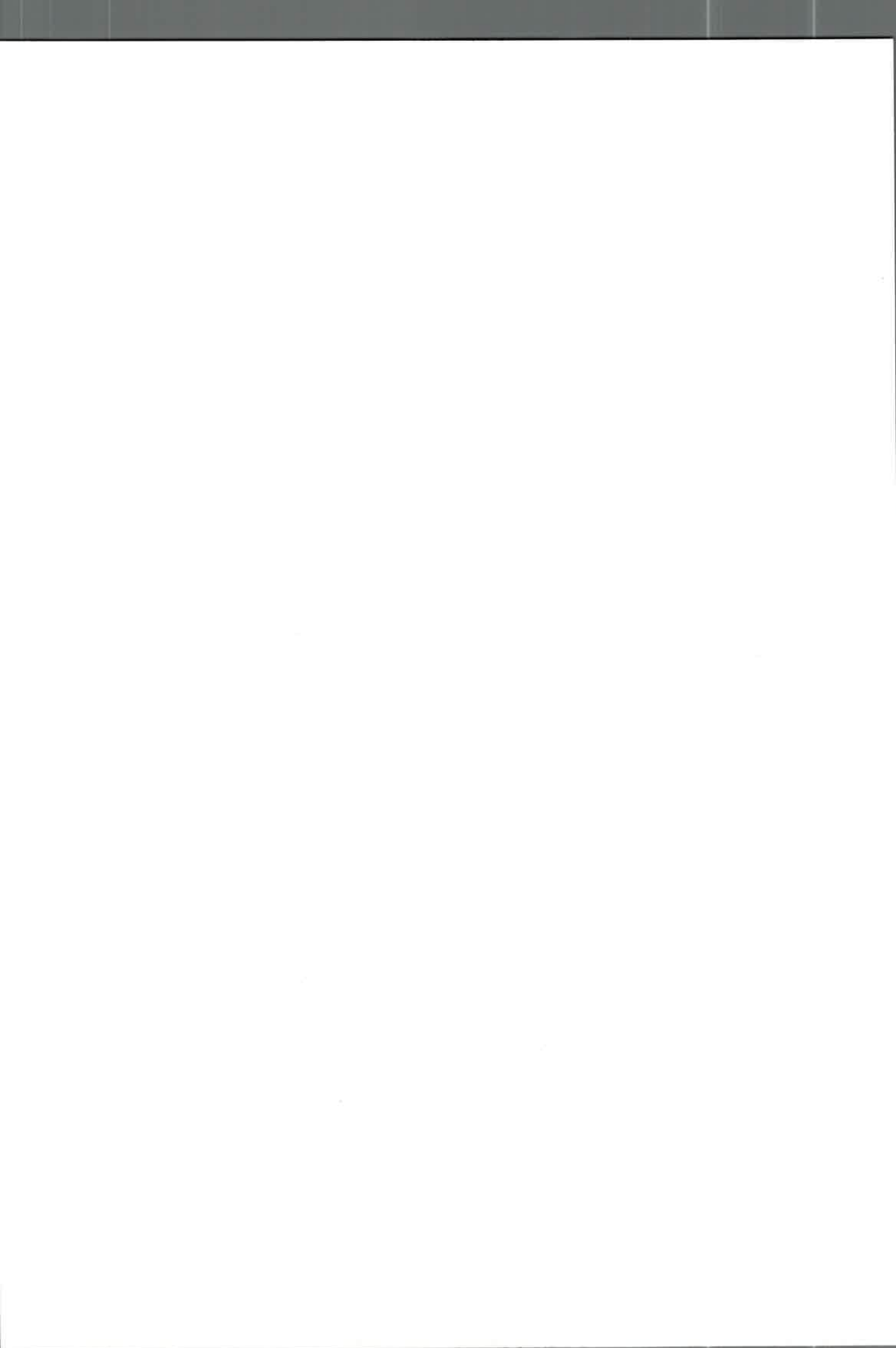
Resultados	27
<i>Pleurodema tucumanum</i>	27
Citogenética	27
Eritrometría	28
<i>Pleurodema guayapae</i>	29
Citogenética	29
Eritrometría	29
<i>Pleurodema nebulosum</i>	30
Citogenética	30
Eritrometría	30
<i>Pleurodema kriegi</i>	31
Citogenética	31
Eritrometría	32
<i>Pleurodema cordobae</i>	33
Citogenética	33
Eritrometría	34
Eritrometría comparativa entre especies	35
Discusión	37

Capítulo III: Aspectos morfométricos de las especies

<u>del género <i>Pleurodema</i> del área central de Argentina</u>	42
Introducción	42
Materiales y Métodos	44
Resultados	47
<i>Pleurodema tucumanum</i>	47



<i>Pleurodema guayapae</i>	49
<i>Pleurodema nebulosum</i>	51
<i>Pleurodema kriegi</i>	53
<i>Pleurodema cordobae</i>	55
Comparaciones interespecíficas	57
Comparaciones entre especies sin glándulas	62
Comparaciones entre especies con glándulas	63
Discusión	64
<u>Capítulo IV: Aspectos bioacústicos de las especies</u>	
<u>del género <i>Pleurodema</i> del área central de Argentina</u>	68
Introducción	68
Materiales y Métodos	71
Resultados	77
<i>Pleurodema tucumanum</i>	77
<i>Pleurodema guayapae</i>	81
<i>Pleurodema nebulosum</i>	83
<i>Pleurodema kriegi</i>	87
<i>Pleurodema cordobae</i>	92
Comparaciones interespecíficas	97
Cantos simples	97
Cantos compuestos	101
Discusión	105
<u>Discusión y Conclusiones generales</u>	117



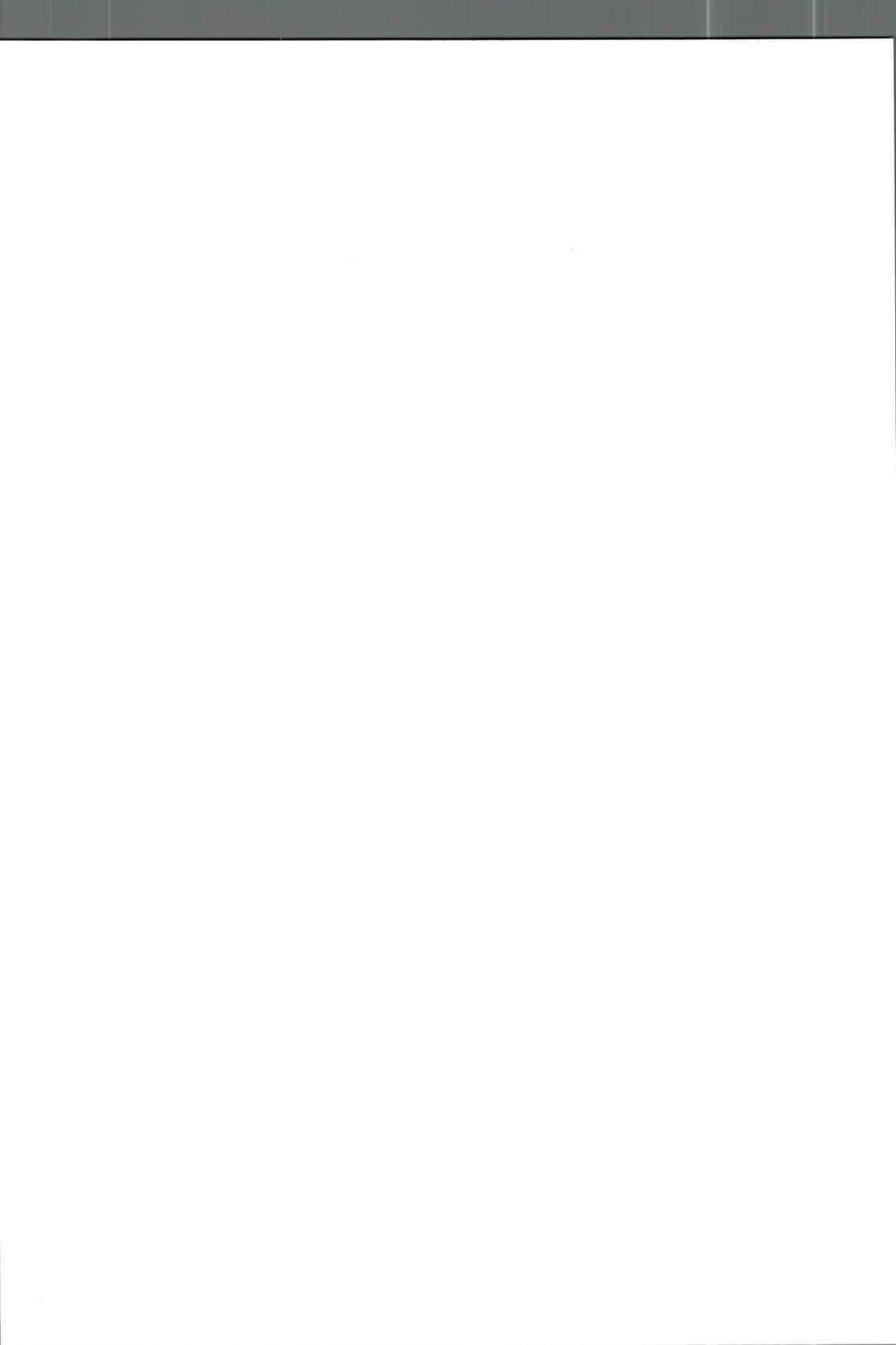
Bibliografía

125

Anexo

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.

135



ÍNDICE DE FIGURAS

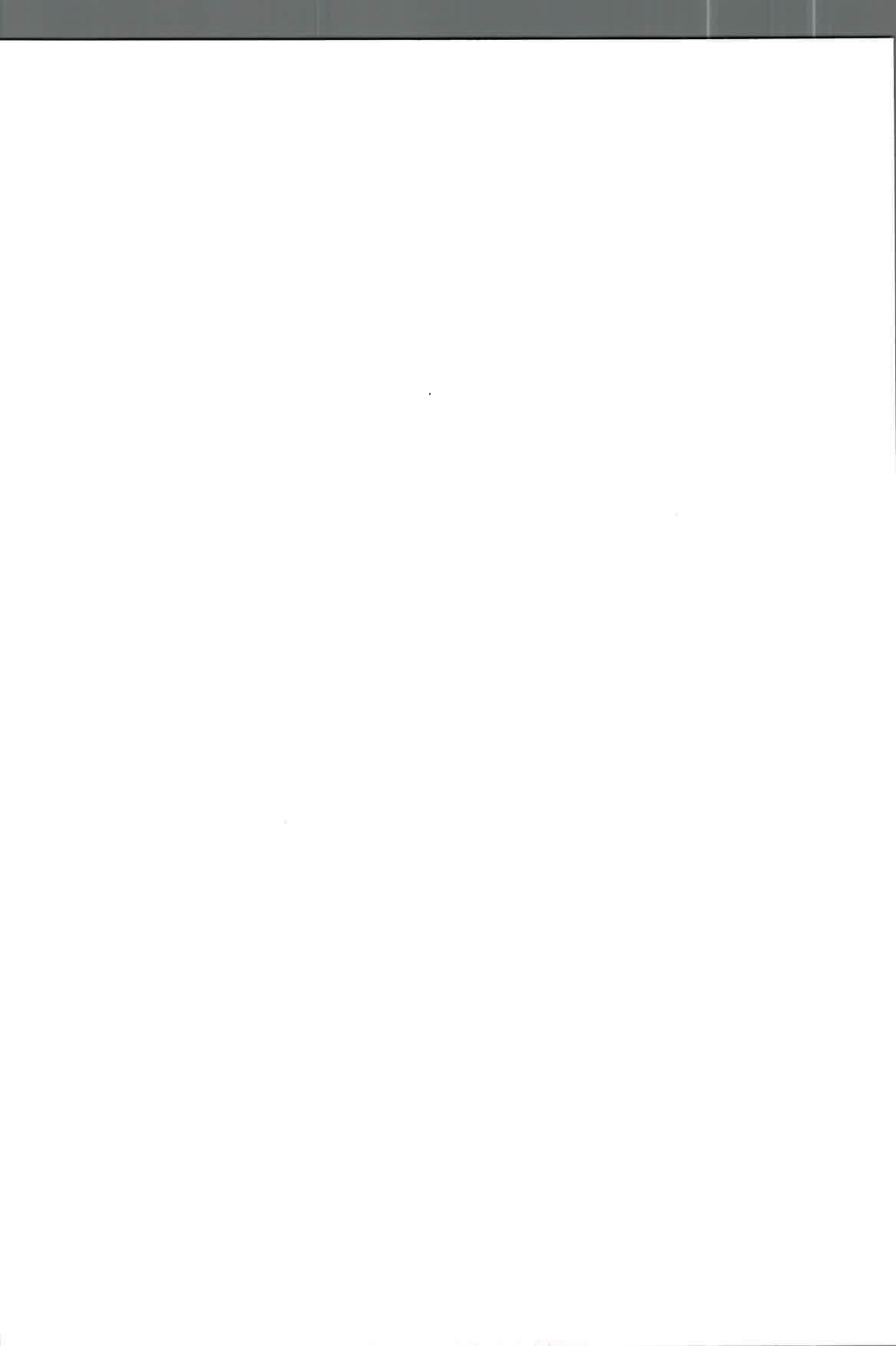
- Figura 1:** Ecorregiones de Argentina propuestas por Burkart *et al.* (1999). En elipse sombreada se detalla el área de estudio de este trabajo 9
- Figura 2:** Localidades de muestreo en el área central de Argentina de las diferentes especies del género *Pleurodema* comprendidas en este trabajo. Con círculos negro se indican las localidades de *Pleurodema tucumanum*, con círculos azules las localidades de *Pleurodema nebulosum*, con círculos rojos las localidades de *Pleurodema guayapae*, con círculos verdes las localidades de *Pleurodema kriegi* y con círculo amarillo la localidad de *Pleurodema cordobae*. 11
- Figura 3:** Ambientes característicos de la zona Espinal en ecotono con la Llanura Pampeana utilizados por las diferentes poblaciones de *Pleurodema* para reproducirse. a) Charca temporaria originada sobre un camino secundario perpendicular a la Ruta Nacional 8 en el Km. 651.5. b) Charca semipermanente originada por escurrimiento del agua de lluvia, Ruta Nacional 36, Km. 625. c) Charcas semipermanentes originadas por el desborde del arrollo Tegua, Ruta Nacional 36, Km. 649. 12
- Figura 4:** Individuo de *Pleurodema tucumanum* cantando desde el borde de una laguna temporaria (Fig. 3a). Ruta nacional 8, Km. 651.5; 28 de Noviembre de 2009. 22:20 hs. Temperatura del sustrato 29°C. 12
- Figura 5:** Ambientes característicos de la zona del Chaco Árido utilizados por las diferentes poblaciones de *Pleurodema* para reproducirse. a) Laguna permanente: Represa privada en cercanías a la localidad de Patquía, La Rioja. b) Charca temporaria originada por escurrimiento del agua de lluvia, cruce entre las Rutas Nacionales 38, 74 y 150. Patquía, La Rioja. c) Alcantarilla ubicada en el Km. 350 de la Ruta Nacional 38, en cercanías a la localidad de Patquía, La Rioja. d) Charcas temporarias originadas por el desborde del Río Colorado, Ruta Nacional 4, Km. 357.5, en cercanías a la localidad de Patquía, La Rioja. 14



- Figura 6:** Individuos de *P. guayapae* y *P. tucumanum* en actividad reproductiva. Charca temporaria (Fig. 5b) originada posterior a una lluvia. Entrada a Patquía, La Rioja; 18 de Enero de 2009. 05:20 hs. Temperatura del agua 23.8°C, Temperatura del sustrato 19°C. a) Individuo de *Pleurodema guayapae* cantando desde el interior de la laguna. b) Individuo de *Pleurodema tucumanum* cantando desde el borde interno de la laguna. c) Individuo de *Pleurodema guayapae* cantando desde el exterior de la charca. d) Amplexo de *P. guayapae* en el exterior de la laguna. 15
- Figura 7:** Ambientes característicos de la zona alta de las Sierras de Córdoba, caracterizado por un pastizal de altura. a) Vista panorámica del ambiente en Pampa de Achala, Córdoba. b) Vista panorámica del ambiente en Sierra de Comechingones, Córdoba. c) Laguna típica utilizada por *Pleurodema kriegi* para desarrollar sus actividades reproductivas, La Posta, Pampa de Achala, Córdoba. d) Laguna típica utilizada por *Pleurodema cordobae* para desarrollar sus actividades reproductivas, Localidad tipo de *P. cordobae*, Sierra de Comechingones, Córdoba. 17
- Figura 8:** Individuo de *Pleurodema cordobae* cantando flotando desde el interior de una laguna (Fig. 7d). Localidad tipo de *P. cordobae*, Sierra de Comechingones, Córdoba; 30 de Enero de 2008. 21:30 hs. Temperatura del agua 19.3°C. 17
- Figura 9:** Laguna típica utilizada por *P. tucumanum* y *P. nebulosum* para desarrollar sus actividades reproductivas en el ambiente de Chaco-Monte presente en Ischigualasto, San Juan. 18
- Figura 10:** Individuo de *Pleurodema tucumanum* cantando flotando desde el interior de una laguna, Ischigualasto, San Juan; 21 de Diciembre de 2007. 22:30 hs. Temperatura del agua 19°C. 19
- Figura 11:** Distancia mayor (DM) y distancia menor (Dm) de un eritrocito, variables medidas para el cálculo de área de los eritrocitos 25
- Figura 12:** Cariotipo de *Pleurodema tucumanum*, La Punilla, San Luis (2n=2x=22). 27
- Figura 13:** Diacinesis de *Pleurodema tucumanum*, Las Rosas, Córdoba (2n=2x=22). 27
- Figura 14:** Diacinesis de *Pleurodema guayapae*, Patquía, La Rioja. (2n=2x=22). 29
- Figura 15:** Diacinesis de *Pleurodema nebulosum*, Sampacho, Córdoba (2n=2x=22) 30



Figura 16: Cariotipo de <i>Pleurodema kriegi</i> , La Posta, Pampa de Achala (2n=4x=44).	31
Figura 17: Diacinesis de <i>Pleurodema kriegi</i> , La Posta, Pampa de Achala (2n=4x=44)	31
Figura 18: Cariotipo de <i>Pleurodema cordobae</i> , Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, (2n=8x=88).	33
Figura 19: Diacinesis de <i>Pleurodema cordobae</i> , Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, (2n=8x=88).	33
Figura 20: Tamaño de los eritrocitos para las cinco especies de <i>Pleurodema</i> estudiadas. Se muestra la media (asterisco) y el intervalo de confianza de Bonferroni de 95%.	35
Figura 21: Eritrocitos de las diferentes especies de <i>Pleurodema</i> . a) <i>P. tucumanum</i> (diploide), b) <i>P. guayapae</i> (diploide), c) <i>P. nebulosum</i> (diploide), d) <i>P. kriegi</i> (tetraploide), e) <i>P. cordobae</i> (octoploide)	36
Figura 22: Variables morfométricas relevadas en los individuos adultos de las diferentes especies del género <i>Pleurodema</i> estudiadas. Ver abreviaciones en el texto.	44
Figura 23: Foto de ejemplar macho adulto de <i>Pleurodema tucumanum</i> . Holmberg, Córdoba.	47
Figura 24: Foto de ejemplar macho adulto de <i>Pleurodema guayapae</i> . Patquía, La Rioja.	49
Figura 25: Foto de ejemplar macho adulto de <i>Pleurodema nebulosum</i> . Sampacho, Córdoba.	51
Figura 26: Foto de ejemplar macho adulto de <i>Pleurodema kriegi</i> . La Posta, Pampa de Achala, Córdoba.	53
Figura 27: Foto de ejemplar macho adulto de <i>Pleurodema cordobae</i> . Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, Córdoba.	55
Figura 28 a) Diagrama de dispersión de los valores de los dos primeros Componentes Principales para <i>P. tucumanum</i> (*), <i>P. nebulosum</i> (+), <i>P. guayapae</i> (x), <i>P. kriegi</i> (o) y <i>P. cordobae</i> (□). Los eigenvalores, eigenvectores y el porcentaje de varianza explicada por cada componente se muestran en la Tabla 21. b) Diagrama de dispersión de las variables morfométricas sobre los primeros dos Componentes.	59
Figura 29: Diagrama de dispersión de los valores de las dos Funciones Discriminantes basadas en variables morfométricas para <i>P. tucumanum</i> (*), <i>P. nebulosum</i> (+), <i>P. guayapae</i> (x), <i>P. kriegi</i> (o) y <i>P. cordobae</i> (□).	60



- Figura 30:** Oscilograma de un canto simple tipo donde se indican las variables temporales relevadas en el análisis bioacústico para *Pleurodema tucumanum*, *Pleurodema guayapae* y *P. nebulsum*. Abreviaciones ver texto. 73
- Figura 31:** Oscilograma de un canto compuesto tipo donde se indican las variables temporales relevadas en el análisis bioacústico para *Pleurodema kriegi* y *P. cordobae*. Abreviaciones ver texto. 74
- Figura 32:** Canto de advertencia de *Pleurodema tucumanum*. Oscilograma, sonograma y espectrograma Temperatura del agua 25°C. 78
- Figura 33:** Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema tucumanum* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración del canto, b) Intervalo entre cantos, c) Frecuencia dominante, d) Duración del pulso, e) Intervalo entre pulsos y f) Tasa de pulsos. 80
- Figura 34:** Canto de advertencia de *Pleurodema guayapae*. Oscilograma, sonograma y espectrograma. Temperatura del agua 20.4°C 81
- Figura 35:** Canto de advertencia de *Pleurodema nebulosum*. Oscilograma, sonograma y espectrograma Temperatura del agua 23.3°C, Sampacho, Córdoba. 83
- Figura 36:** Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema nebulosum* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración del canto, b) Intervalo entre cantos, c) Pulsos/Canto, d) Frecuencia dominante, e) Duración del pulso y f) Tasa de pulsos. 85
- Figura 37:** Canto de advertencia de *Pleurodema kriegi*. Oscilograma, sonograma y espectrograma. La Posta, Córdoba. Temperatura del agua 20.7°C. 88
- Figura 38:** Oscilograma de fragmento del canto de advertencia de *Pleurodema kriegi* mostrando tres trenes de pulsos con tres pulsos cada uno. La Posta, Córdoba. Temperatura del agua 20.7°C. 88
- Figura 39:** Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema kriegi* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración de trenes de pulsos, b) Duración intertrenes de pulsos, c) Tasa de pulsos, d) Tasa de trenes de pulsos, e) Intervalo entre pulsos 1, f) Intervalo entre pulsos 2. 91



- Figura 40:** Canto de advertencia de *Pleurodema cordobae*. Oscilograma, sonograma y espectrograma. Los Tabaquillos, Córdoba. Temperatura del agua 19.3°C 92
- Figura 41:** Oscilograma de fragmento del Canto de advertencia de *Pleurodema cordobae* mostrando tres trenes de pulsos con tres pulsos cada uno. Los Tabaquillos, Córdoba. Temperatura del agua 19.3°C. 93
- Figura 42:** Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema cordobae* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración de trenes de pulsos, b) Intervalo entre trenes de pulsos, c) Tasa de pulsos, d) Tasa de trenes de pulsos, e) Duración del pulso 1, f) Duración del pulso 2, g) Duración del pulso 3, h) Intervalo entre pulsos 1, i) Intervalo entre pulsos 2. 95
- Figura 43:** a) Diagrama de dispersión de los valores de los dos primeros Componentes Principales para *P. tucumanum* (□), *P. nebulosum* (×) y *P. guayapae* (○). Los eigenvalores, eigenvectores y el porcentaje de varianza explicada por cada componente se muestran en la Tabla 49. b) Diagrama de dispersión de las variables bioacústicas sobre los primeros dos Componentes. 98
- Figura 44:** Diagrama de dispersión de los valores de las dos Funciones Discriminantes basadas en variables bioacústicas para *P. tucumanum* (□), *P. nebulosum* (×) y *P. guayapae* (○) 99
- Figura 45:** Diagrama de dispersión de los valores de los dos primeros Componentes Principales para *P. kriegi* (□) y *P. cordobae* (×). Los eigenvalores, eigenvectores y el porcentaje de varianza explicada por cada componente se muestran en la Tabla 54. 102



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Localidades de muestreos para las diferentes poblaciones de <i>Pleurodema</i> estudiadas	8
Tabla 2: Número de células en diacinesis y metafases analizadas en las diferentes especies de <i>Pleurodema</i> consideradas.	24
Tabla 3: Número de individuos examinados de las diferentes especies de <i>Pleurodema</i> estudiadas mediante Eritrometría.	26
Tabla 4: Promedio, desvío estándar y rango de las áreas de eritrocitos (μm^2) en <i>Pleurodema tucumanum</i> estandarizados al SVL promedio de la especie (33.78mm).	28
Tabla 5: Media, desvío estándar y rango de las áreas de eritrocitos (μm^2) de <i>Pleurodema guayanae</i> .	29
Tabla 6: Media, desvío estándar y rango de las áreas de eritrocitos (μm^2) de <i>Pleurodema nebulosum</i> .	30
Tabla 7: Media, desvío estándar y rango de las áreas de eritrocitos (μm^2) de <i>Pleurodema kriegi</i> .	32
Tabla 8: Media, desvío estándar y rango de las áreas de eritrocitos (μm^2) en <i>Pleurodema cordobae</i> .	34
Tabla 9: Test de Bonferroni para comparar el tamaño de los eritrocitos en las diferentes especies de <i>Pleurodema</i> .	35
Tabla 10: Número de individuos examinados de las diferentes especies de <i>Pleurodema</i> estudiadas mediante Morfometría y Eritrometría.	46
Tabla 11: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas tanto para machos (n=93) como para hembras (n=16) de <i>Pleurodema tucumanum</i> y su significancia. W representa el estadístico Shapiro-Wilks, p la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).	48
Tabla 12: Media y desvío estándar de las variables morfométricas de la especie <i>Pleurodema tucumanum</i> y estadísticos del test <i>t</i> entre sexos para cada variable (o U de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales). t y U representan el estadístico, p la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes.	48



- Tabla 13:** Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas tanto para machos (n=40) como para hembras (n=17) de *Pleurodema guayapae* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$). 50
- Tabla 14:** Media y desvío estándar de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema guayapae* y estadísticos del test *t* entre sexos para cada variable. **t** representa el estadístico, **p** la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes. 50
- Tabla 15:** Media y desvío estándar de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema nebulosum*. 51
- Tabla 16:** Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas para machos (n=21) de *Pleurodema nebulosum* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$). 52
- Tabla 17:** Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas tanto para machos (n=21) como para hembras (n=7) de *Pleurodema kriegi* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$). 54
- Tabla 18:** Media y desvío estándar de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema kriegi* y estadísticos del test *t* entre sexos para cada variable (o U de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales). **t** y **U** representan el estadístico, **p** la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes. 54
- Tabla 19:** Media y desvío estándar de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema cordobae*. 56
- Tabla 20:** Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas para machos (n=37) de *Pleurodema cordobae* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$). 56
- Tabla 21:** Eigenvectores, eigenvalores y porcentaje de varianza explicada para los tres Factores con eigenvalores mayores a 1 resultantes del Análisis de Componentes Principales, luego de la rotación varimax, para los datos de morfometría de las cinco especies de *Pleurodema* (*P. tucumanum*, *P. nebulosum*, *P. guayapae*, *P. cordobae* y *P. kriegi*). Se destacan las variables de mayor importancia en cada Factor. 57



RESUMEN

En el presente estudio se determinó la biodiversidad de especies del género *Pleurodema* presentes en el área central de Argentina y se evaluó la utilidad de tres conjuntos de caracteres, independientes entre sí, morfométricos, etológicos y celulares para identificar los diferentes *taxa* del género *Pleurodema*. Para ello se determinó la presencia de poblaciones del género *Pleurodema* en el área central de Argentina y se caracterizó a las diferentes especies del género mediante Citogenética, Eritrometría, Morfometría y Bioacústica. Las tareas de campo se realizaron en el periodo comprendido entre Diciembre de 2004 y Febrero de 2010, relevando 18 localidades de las provincias de Córdoba, San Luis, La Rioja y San Juan. Los muestreos se realizaron principalmente desde el atardecer al amanecer, donde se registraron los cantos de advertencia y se relevaron las temperaturas del agua y del sustrato como así también el sitio de canto de cada individuo. Posteriormente se capturaron individuos para ser analizados en el laboratorio mediante citogenética, eritrometría y morfometría. En el área central de Argentina se identificaron 5 especies del género *Pleurodema*; *P. tucumanum*, *P. guayapae*, *P. nebulosum*, *P. kriegi* y *P. cordobae*. El análisis citogenético y eritrométrico de estas especies indicó que las primeras tres son diploides, *P. kriegi* es tetraploide y *P. cordobae* es octoploide. La morfometría de las diferentes especies del género *Pleurodema* se caracterizó en base a 17 variables morfométricas. El análisis morfométrico multivariado de las cinco especies demuestra la presencia de dos grupos bien separados, conformados uno por las especies poseedoras de glándulas lumbaras y el otro por aquellas carentes de las mismas. Entre *P. kriegi* y *P. cordobae* no se encontraron caracteres morfológicos diagnósticos. Los registros acústicos se digitalizaron y se midieron a cada canto siete variables temporales y la frecuencia dominante. Posteriormente se determinó cuales variables son temperatura-dependientes y se cuantificaron los efectos de la temperatura sobre estas variables mediante análisis de regresión lineal, utilizando la temperatura del agua como variable independiente y a la variable acústica de interés como variable dependiente. De acuerdo a los patrones temporales, los cantos de advertencia de *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum* corresponden a cantos simples, en tanto que los cantos de *P. kriegi* y *P. cordobae* corresponden a cantos compuestos. El análisis bioacústico entre las especies de canto simple considerando el efecto de la temperatura indicó una clara separación entre ellas, mostrando diferencia en todas las variables analizadas. Por el contrario, *P. kriegi* y *P. cordobae* son difícilmente distinguibles al oído humano. Sin embargo, el análisis bioacústico controlando el efecto de la temperatura permitió determinar diferencias interespecíficas y la tasa de pulsos resultó una de las variables clasificatorias. Los resultados obtenidos indican que la morfometría, la bioacústica y la citogenética muestran diferentes grados de variabilidad entre las especies estudiadas y el uso de este conjunto de caracteres independientes entre sí permitió caracterizar e identificar inequívocamente las especies de *Pleurodema* en estudio. Tal es así, que el hallazgo y descripción de *Pleurodema cordobae* bajo este estudio no podría haber sido llevado a cabo sin el análisis integrado de varios caracteres independientes, ya que esta especie es críptica con *P. kriegi*.



ABSTRACT

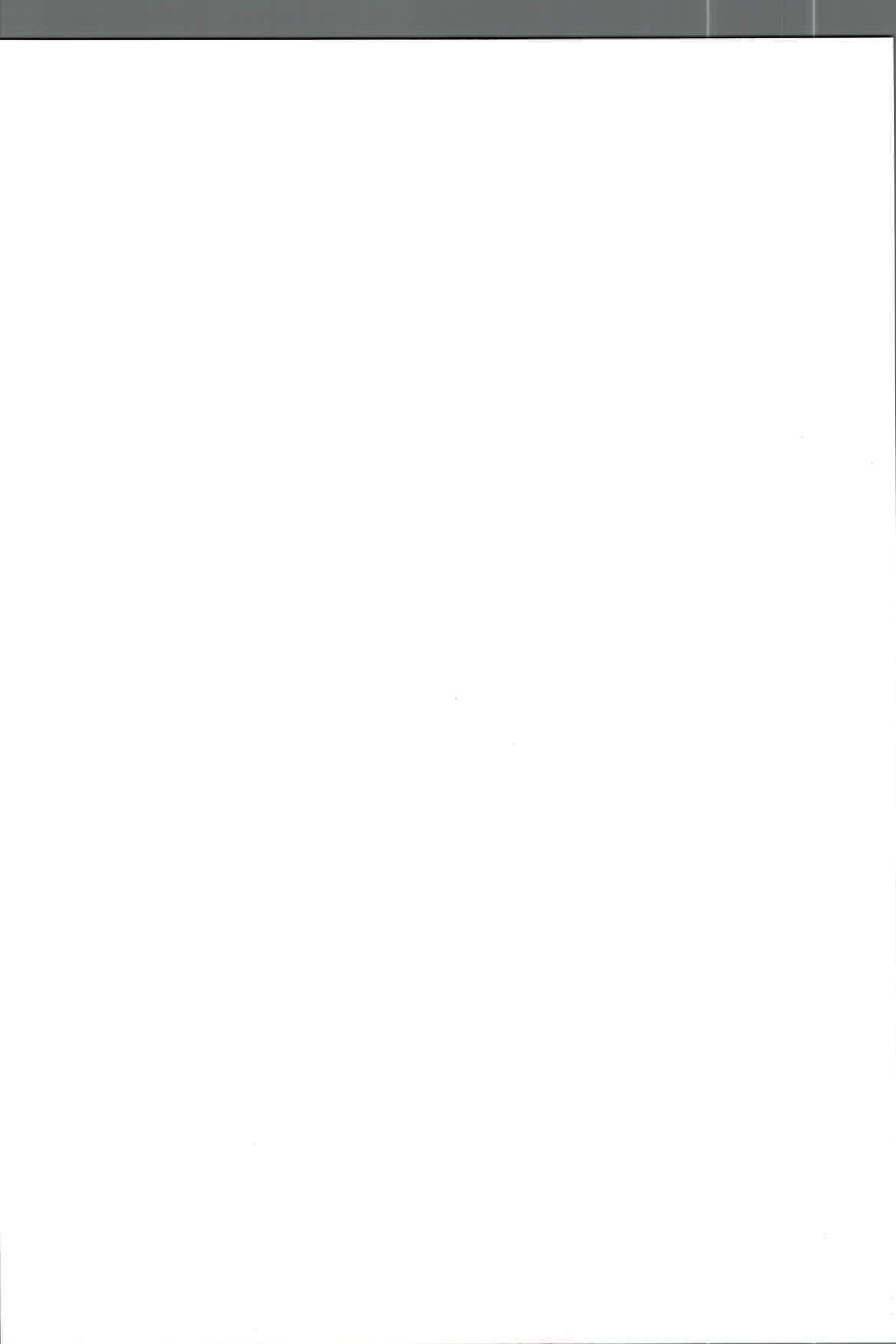
In the present study, the biodiversity of *Pleurodema* species in the central area of Argentina was determined, and the usefulness of three independent character complexes (morphometric, ethological and cellular characters) was evaluated to identify the different *taxa* of the genus *Pleurodema*. The presences of genus *Pleurodema* populations in the central area of Argentina were identified and the different species of the genus were characterized by means of Cytogenetics, Eritrometry, Morphometry and Bioacoustics. Field work was undertaken in eighteen localities from Córdoba, San Luis, La Rioja and San Juan province between December 2004 and February 2010. The acoustic recordings were mainly realized from dusk to dawn. Immediately, water and substrate temperatures in the site of each caller individual were measured. Subsequently, some individuals were captured to realize cytogenetic, eritrometric and morphometric analyses. Five species of the genus *Pleurodema* were found in the central area of Argentina (*P. tucumanum*, *P. guayapae*, *P. nebulosum*, *P. kriegi* and *P. cordobae*). Cytogenetic and eritrometric analyses of these species indicated that *P. tucumanum*, *P. guayapae* and *P. nebulosum* are diploid, *P. kriegi* is tetraploid and *P. cordobae* is octoploid. Morphometry of different genus *Pleurodema* species was characterized on 17 morphometric variables. Multivariate morphometric analysis of the five species shows the presence of two well separated groups, one formed by species possessing lumbar glands and the other by those lacking them. No diagnostic morphological characters were found between *P. kriegi* and *P. cordobae*. The acoustic recordings were digitized and seven temporary variables and dominant frequency to each call were measured. Subsequently, variables temperature-dependent were identified and the effect of temperature on those variables was quantified by Linear Regression Analysis using water temperature as the independent variable and the acoustic variable as dependent variable. According to temporal patterns, the advertisement call of *P. tucumanum*, *P. guayapae* and *P. nebulosum* correspond to a single call, while the calls of *P. kriegi* and *P. cordobae* correspond to compound calls. Bioacoustic analysis between the species of single calls considering the temperature effect indicated a clear separation between them, showed differences in all variables. In contrast, *P. kriegi* and *P. cordobae* are difficultly distinguishable to the human ear. However, bioacoustic analysis considering the temperature effect revealed interspecific differences and the pulse rate was one of the classificatory variables. These results indicate that morphometric, bioacoustic and cytogenetic data show different degrees of variability among the species studied and the use of these three independent character complexes allowed unequivocally identify and characterize *Pleurodema* species under study. So much so, that the discovery and description of *Pleurodema cordobae* under this study could not have been accomplished without the integrated analysis of several independent characters, since this species is cryptic with *P. kriegi*.



INTRODUCCIÓN GENERAL

Los anfibios son un grupo taxonómico que se originaron evolutivamente en el Devónico Superior, hace aproximadamente 350 millones de años (Duellman & Trueb, 1986) y tuvieron una primera radiación en el Triásico (Zug *et al.*, 2001). Estos primeros tetrápodos pudieron colonizar y explotar los diferentes ambientes terrestres antes no utilizados por otros vertebrados. Las nuevas presiones de selección que implicó el ambiente terrestre para los anfibios, promovió a través de la evolución la adquisición de diferentes patrones comportamentales, fisiológicos y morfológicos que les permitió diversificarse y colonizar diversas regiones del planeta. Actualmente, treinta y nueve modos reproductivos han sido registrado en los anfibios de todo el mundo (Haddad & Prado, 2005) y 16 para los anuros presentes en Argentina (Lavilla & Rougès, 1992; Lavilla, 2009), los cuales se presentan en los diferentes grupos taxonómicos y tienen una estrecha relación con los ambientes que utilizan para la reproducción.

De igual manera, teniendo en cuenta el periodo de actividad reproductiva, hay especies de anuros que se mantienen activas reproductivamente durante un largo periodo, en tanto que en el otro extremo se encuentran aquellas especies que solamente aprovechan para reproducirse las charcas temporarias formadas luego de una lluvia abundante, desarrollando su actividad reproductiva en un lapso corto de tiempo. Según este comportamiento, dichas especies de anuros fueron clasificadas como especies de reproducción prolongadas o explosivas, respectivamente (Wells 1977), aunque existe un continuo entre estos dos tipos de reproducción. Estudios comparativos sugieren que estas fenologías reproductivas son adaptativas y frecuentemente se correlacionan con el hábitat reproductivo, cambios estacionales en el clima o la presencia de potenciales depredadores (Bragg 1945; Wilbur & Alford 1985; Duellman & Trueb, 1986). Por lo



tanto, las especies de reproducción prolongada se encuentran en ambientes más estables que aquellas especies de reproducción explosivas. En este último caso, y teniendo en cuenta la batracofauna Argentina, las especies que poseen una estrategia reproductiva explosiva se encuentran en ambientes temporarios, en las regiones xerófilas, halófitas y en general semidesérticas ó subhúmedas, como en las eco-regiones del chaco seco, del monte, del espinal y pampeana, donde las lluvias son marcadamente estacionales.

Desde el punto de vista de sus ecorregiones, Argentina presenta una amplia gama de paisajes correspondientes al clima subtropical templado, que incluye desde selvas subtropicales hasta estepas xerófilas, brindando una variada gama de oportunidades en cuanto a la explotación de nichos y las posibles adaptaciones que pueden tener lugar. Actualmente, en Argentina se ha señalado la presencia de 175 especies de anfibios distribuidas en 40 géneros de anuros y tres géneros de cecilias. (Frost, 2011).

En la última década, varios estudios de dinámica poblacional han puesto en relieve a los anfibios por su declinación y por la extinción de numerosas especies. Las causas más sugeridas sobre las disminuciones poblacionales y la extinción de especies en los anfibios a nivel planetario son el calentamiento global, la mayor incidencia de rayos ultravioletas debido al adelgazamiento de la capa de ozono y la lluvia ácida, entre otros, mientras que a un nivel más regional la fragmentación y modificación del hábitat, la introducción de especies exóticas y el uso desmedido de agroquímicos son los factores más relevantes (Lavilla, 2001; Heyer, 2003; Beebee & Griffiths, 2005; Reading, 2007). Por otra parte, siguen resultando necesario la concreción de estudios locales para conocer la riqueza específica de un lugar o región. En este sentido, hay especies que son desconocidas por la comunidad científica, sean porque están presentes



en ambientes aún no explorados o porque dentro de un complejo de poblaciones existen especies “crípticas” que no pueden ser diferenciadas como tales. Las especies gemelas (“Sibling species”) o especies crípticas (“cryptic species”) son aquellas especies que son extremadamente similares en apariencia (morfología, fisiología y comportamiento) pero se hallan reproductivamente aisladas entre sí (Bickford *et al.*, 2007). Algunos autores consideran que las especies gemelas son el resultado de un proceso reciente de diferenciación. Sin embargo, si la nueva especie permanece sujeta a presiones de selección muy similares, las dos especies podrían permanecer por un largo periodo de tiempo sin diferenciarse apreciablemente (Beheregaray & Cacconet, 2007).

Hay grupos taxonómicos dentro de los anuros que no han recibido mucha atención y se conoce poco respecto de su biología. El género *Pleurodema* es uno de estos casos. Este género, perteneciente a la familia Leiuperidae, se encuentra ampliamente distribuido desde Panamá hasta el Sur de Argentina y Chile, pasando por numerosas regiones con características ambientales muy diferentes (Lynch, 1971; Heyer, 1975; Duellman & Veloso, 1977; Cei, 1962; Cei, 1980; Hödl, 1992; Grant *et al.*, 2006; Frost, 2011). Duellman & Veloso (1977) asumen que la diferenciación y dispersión de *Pleurodema* comenzó en el Oligoceno en la región que hoy conocemos como los bosques australes de Sudamérica (Chile y Argentina). En la actualidad el género está representado por quince especies, de las cuales diez se presentan en Argentina (Frost, 1985; Cei, 1987; McLister *et al.*, 1991, Nascimento *et al.*, 2006, Valetti *et al.*, 2009, Maciel & Nunes, 2010).

Duellman & Veloso (1977) realizaron una importante contribución al proponer las relaciones filogenéticas dentro del género *Pleurodema* a través de un modelo biogeográfico. Sin embargo, como fue destacado por Barrio (1977) al referirse a *P.*



bibroni y *P. kriegi*, “estos autores suponen equivocadamente que estas dos especies depositan sus huevos en nidos de espuma, razón por la que el grado de parentesco con otras del mismo género resulta erróneo al tomarse como base este carácter”. Por otra parte, el análisis bioacústico realizado en dicho trabajo está basado en un tamaño muestral bajo por especie. Barrio (1964) identifica las tres especies crípticas de *Pleurodema* que habitan en simpatria en la zona central de Argentina y destaca que el elemento principal que permitió el reconocimiento fue el canto de advertencia. Sin embargo, ninguno de estos estudios anteriores exploró cuantitativamente el efecto de la temperatura sobre las diferentes variables acústicas. En este sentido, es necesario contar con una cantidad considerable de muestras de cantos en un extenso rango de temperaturas de grabación para la aplicación de métodos que permitan cuantificar el efecto de la temperatura sobre las variables acústicas.

Varios trabajos realizados en *Pleurodema* se focalizaron en la distribución geográfica, estableciendo el área de distribución de algunos taxones o corroborando la presencia de estos (Cei & Roig, 1964; Gallardo, 1968; Braun, 1973; Martori & Ávila, 1988; Lavilla *et al.*, 1992; Haene, 1994; Martori *et al.*, 1994; Ávila & Priotto, 1995; Martori & Aun, 1995; Céspedes, 1996; di Tada *et al.*, 1996; Céspedes, 1997; Baldo & Gutiérrez, 1997; Vaira, 1997; Aun & Martori, 1999; Úbeda, 2001; Guerreiro & Cruz Baldoni, 2003; Ferraro, 2004; Ferraro & Casagrande, 2009). Otros autores utilizaron caracteres citogenéticos y moleculares en el estudio de las relaciones de parentesco entre especies de *Pleurodema* (Barrio, 1964; Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Bogart & Wasserman, 1972; McLister *et al.*, 1991). Finalmente otros trabajos se centraron en aspectos morfométricos y taxonómicos (Laurent, 1969; Laurent, 1975; Barrio & Rinaldi



de Chieri, 1970; Barrio, 1977; Duellman & Veloso, 1977; McLister *et al.*, 1991, Kolenc *et al.*, 2009).

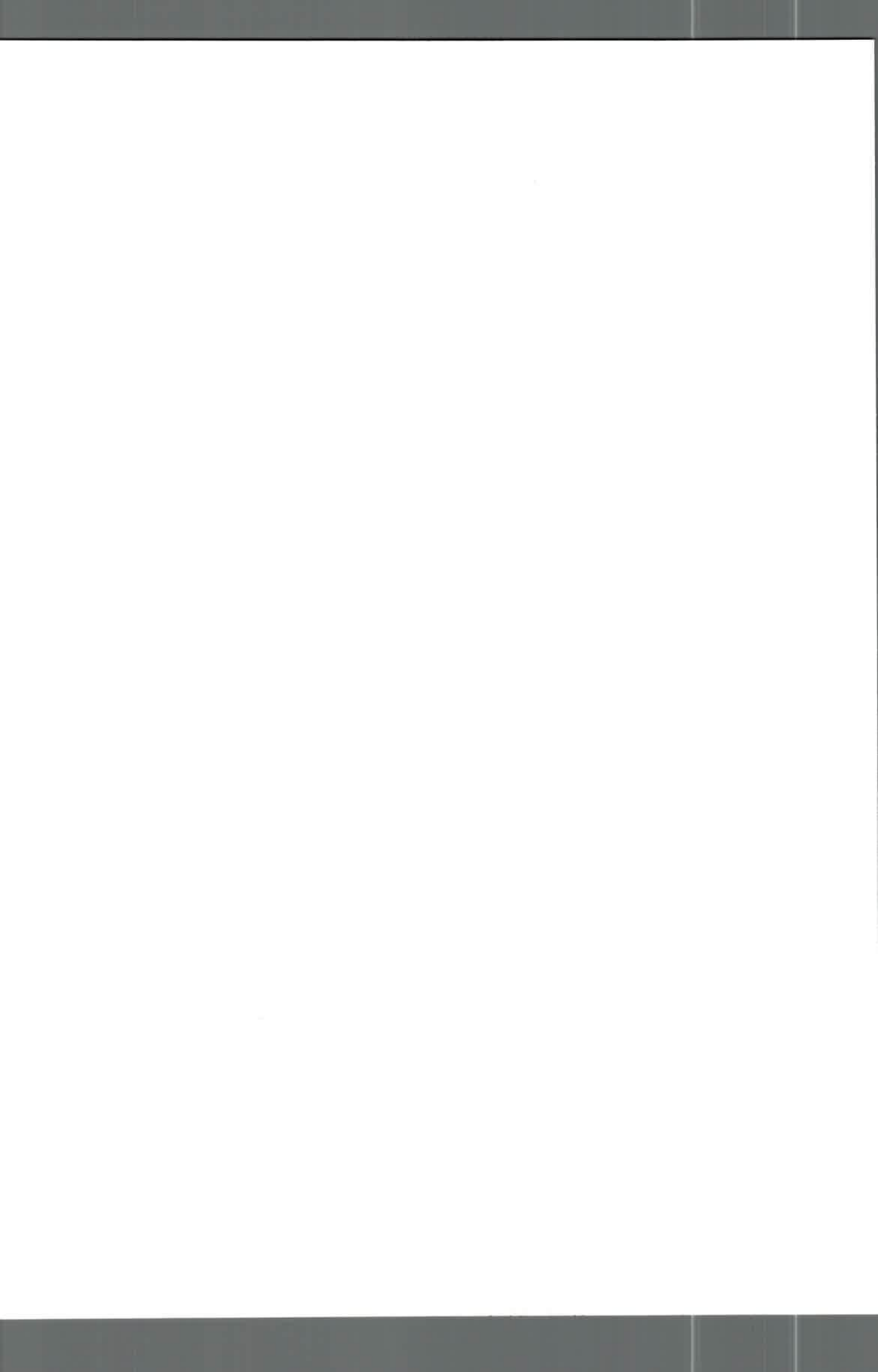
Las primeras clasificaciones taxonómicas, incluso antes que se conociera la teoría evolutiva, se basaron principalmente en aspectos morfológicos de los individuos (Mayden, 1997). En el grupo de los anfibios anuros, posterior a los trabajos pioneros de Bogert (1960) y Blair (1958, 1964) y de Avelino Barrio en Argentina, los elementos del canto de advertencia comenzaron a tener relevancia en los estudios taxonómicos y de especiación (por ejemplo: Barrio, 1964; Littlejohn, 1965; Barrio, 1966; Martin, 1972; Duellman & Piles, 1983, Platz & Forester 1988; Angulo & Reichle 2008; Martino & Sinsch, 2002; Valetti *et al.*, 2009). Actualmente, variables citogenéticas y datos moleculares tales como movilidad electroforética de proteínas, distancias inmunológicas o secuencias de ácidos nucleicos, además de las ya mencionadas, son cada vez más utilizadas (Hillis *et al.*, 1996; Eguiarte, *et al.*, 2007). Para una comparación crítica de la utilidad de estos grupos de caracteres independientes será necesario estudiar géneros o grupos de especies en los cuales se comparen las variables acústicas, morfológicas y citogenéticas en la toma de decisiones taxonómicas. Martino & Sinsch (2002) analizaron poblaciones diploides y tetraploides de *Odontophrynus americanus* en el área central de Argentina con el objeto de evaluar si ellas representaban un par de especies crípticas o si todas las poblaciones pertenecían a la misma especie. Para ello tomaron variables morfométricas, bioacústicas, moleculares y citogenéticas. El análisis multivariado de 15 variables morfométricas mostró un notable grado de diferenciación entre ambas formas, pero las funciones discriminantes no permitieron una identificación inequívoca entre ellas. En contraste, la estructura temporal del canto de advertencia permitió una clara distinción de los diploides y tetraploides. Las distancias genéticas



obtenidas sugirieron una diferenciación del pool génico al nivel de especie y de esta manera llegaron a determinar la presencia de dos especies, denominando a la especie diploide como *Odontophrynus cordobae*.

El área central de Argentina es una región poco analizada desde el punto de vista batracológico, siendo los aportes de Avelino Barrio y José Miguel Cei los más destacados. Justamente es Barrio (1964) quien realiza una comparación de las especies del género *Pleurodema* presentes en la zona de Patquía, La Rioja, describiendo una nueva entidad, *Pleurodema guayapae*. Sin embargo, un análisis comparativo entre las especies del género *Pleurodema* desde el punto de vista morfológico, bioacústico y citogenético en profundidad no ha sido realizado hasta el presente. Este tipo de estudio ha sido abordado por Salas (2004) para las especies del género *Odontophrynus* que se distribuyen en la provincia de Córdoba.

El aislamiento reproductivo entre especies puede darse de diferentes maneras, ya sean por cuestiones geográficas, anatómicas, fisiológicas, genéticas, etológicas o lo que es más probable, una conjunción de algunas de ellas (Blair, 1958, Littlejohn & Martin, 1969; Tandy & Keith, 1972; Straughan, 1973; Duellman & Lescure, 1973; Wells, 1977; Wilson, 1980; Drewry & Rand, 1983; Duellman & Trueb, 1986; Schneider & Sinsch, 1992; Márquez, 1995; Ovaska & Caldbeck, 1997; Narins *et al.*, 1998) y el grado de diferenciación alcanzado por estas especies, en cuanto a la morfometría, ecología y aspectos citogenéticos, a lo largo del tiempo evolutivo puede ser muy variable. De esta manera, nuestra hipótesis de trabajo es que las especies de *Pleurodema* del área central de Argentina tendrán similitudes entre sí en algunas clases de caracteres y mostrarán diferencias en otras. Por lo tanto, el uso de conjuntos de caracteres, independientes entre



sí, permitiría mejorar la caracterización e identificación de los diferentes *taxa* del género *Pleurodema* presentes en el área mencionada.

Los objetivos generales de este trabajo son determinar la biodiversidad de especies del género *Pleurodema* presentes en el área central de la República Argentina y evaluar la utilidad de tres conjuntos de caracteres, independientes entre sí, morfométricos, etológicos y celulares para identificar los diferentes *taxa* del género *Pleurodema*.

Para ellos se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1- Determinar la presencia de poblaciones del género *Pleurodema* en el área central de Argentina e identificar taxonómicamente tales poblaciones.
- 2- Caracterizar las especies del género *Pleurodema* presentes en la zona de estudio mediante Citogenética, Eritrometría, Morfometría y Bioacústica.
- 3- Identificar aquellos caracteres que permitan una clasificación inequívoca de los diferentes *taxa* en estudio.
- 4- Evaluar el grado de diferenciación citogenética, morfométrica y bioacústica entre los diferentes *taxa* del género *Pleurodema* identificados en la zona de trabajo.



CAPÍTULO I: ÁREA DE ESTUDIO

El área central de Argentina, conformada por las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Santiago del Estero, La Rioja, San Luis, Mendoza y San Juan, está asociada zoogeográficamente a la Subregión Andino-Patagónica y al extremo oeste de la Subregión Guayano-brasileña. Ringuelet (1961) define los distintos dominios dentro de estas regiones y establece dentro de la Subregión Andino-Patagónica al Dominio Central o Subandino, caracterizándolo como un territorio de llanura y elevaciones bajas y medias, con vegetación xerófila de “Monte”, “Espinal” y ecotono entre “Chaco” y los anteriores. La fauna de esta región sería fundamentalmente brasílica pero con marcada influencia patagónica al suroeste (Ringuelet, 1961).

Las tareas de campos se realizaron en el área central de Argentina (Fig. 1) relevando 18 localidades de las provincias de Córdoba, San Luis, La Rioja y San Juan en el periodo comprendido entre Diciembre de 2004 y Febrero de 2010 (Tabla 1, Fig. 2).

Tabla 1: Localidades de muestreos para las diferentes poblaciones de *Pleurodema* estudiadas

Especie	Localidad	Provincia	Lat.	Long.	Altitud (msnm)
<i>Pleurodema tucumanum</i>	Espinillo	Córdoba	32°55'14"	64°21'52"	500
	Holmberg	Córdoba	33°13'36"	64°27'48"	433
	Baigorria	Córdoba	32°51'18"	64°21'50"	525
	Alpa Corral	Córdoba	32°42'05"	64°42'17"	767
	Arroyo Tegua	Córdoba	32°42'18"	64°20'52"	535
	Río Cuarto	Córdoba	33°06'20"	64°22'41"	456
	El Cano	Córdoba	32°38'15"	64°35'53"	731
	Las Rosas	Córdoba	31°56'03"	65°02'20"	769
	Sampacho	Córdoba	33°24'17"	64°44'46"	523
	Chancaní	Córdoba	31°22'31"	65°28'44"	351
	Papagayos	San Luis	32°40'49"	64°58'58"	1022
	La Punilla	San Luis	33°07'43"	65°05'20"	976
	Patquía	La Rioja	30°02'19"	66°52'44"	433
	Chamical	La Rioja	30°20'11"	66°20'16"	464
Ischigualasto	San Juan	30°13'20"	67°41'58"	1254	
<i>Pleurodema nebulosum</i>	Sampacho	Córdoba	33°24'17"	64°44'46"	523
	Ischigualasto	San Juan	30°13'20"	67°41'58"	1254
	Aimogasta	La Rioja	28°37'58"	66°51'07"	1065
	Patquía	La Rioja	30°02'19"	66°52'44"	433
<i>Pleurodema kriegi</i>	La Posta, Pampa de Achala	Córdoba	31°36'46"	64°52'29"	2151
<i>Pleurodema cordobae</i>	Extremo Norte de la Sierra de Comechingones	Córdoba	32°23'58"	64°55'35"	2105
<i>Pleurodema guayapae</i>	Patquía	La Rioja	30°02'19"	66°52'44"	433
	Chamical	La Rioja	30°20'11"	66°20'16"	464



Los muestreos se llevaron a cabo en diferentes campañas durante la época de mayor actividad reproductiva de los anfibios (Septiembre – Abril). El horario de muestreo fue principalmente desde el atardecer al amanecer, donde se realizaron los registros acústicos de los cantos de advertencia y se relevaron las temperaturas del agua y del sustrato como así también el sitio de canto de cada individuo. Durante el día se observaron y registraron fotográficamente los ambientes generales de reproducción de cada especie y los microhábitats utilizados por cada individuo. Además se capturaron individuos para ser analizados en el laboratorio mediante morfometría, eritrometría y citogenética.

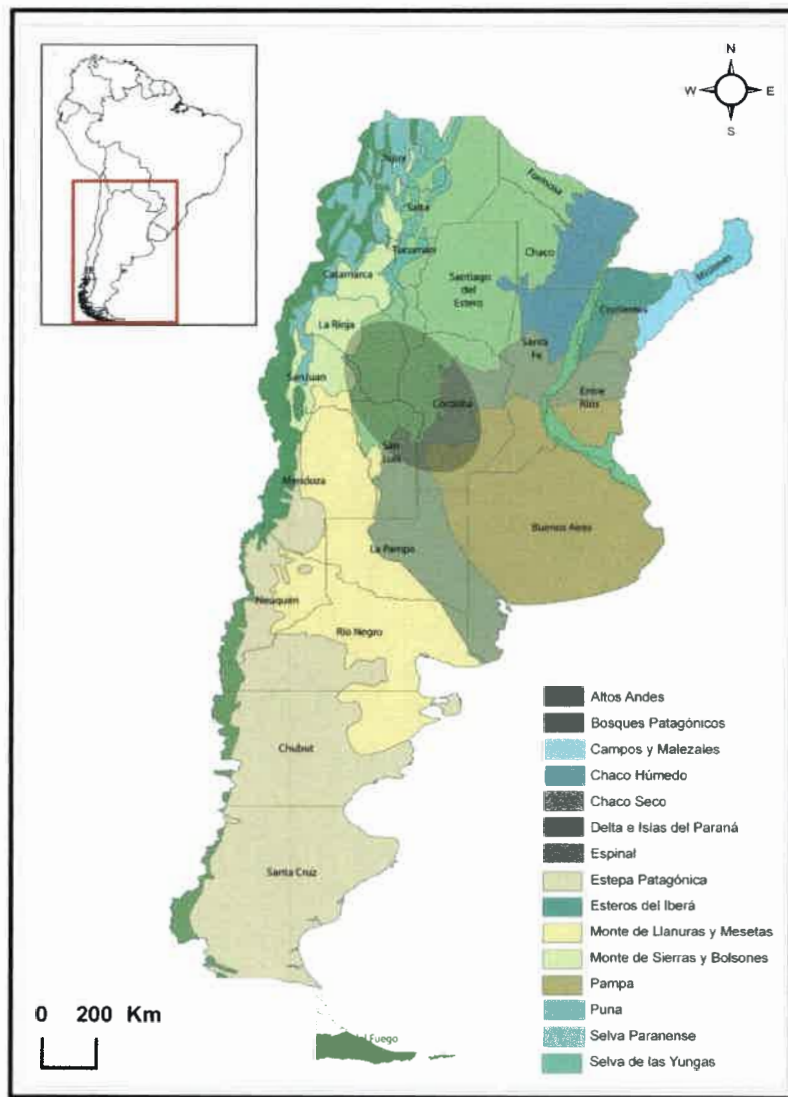


Figura 1: Ecorregiones de Argentina propuestas por Burkart *et al.* (1999). En elipse sombreada se detalla el área de estudio de este trabajo



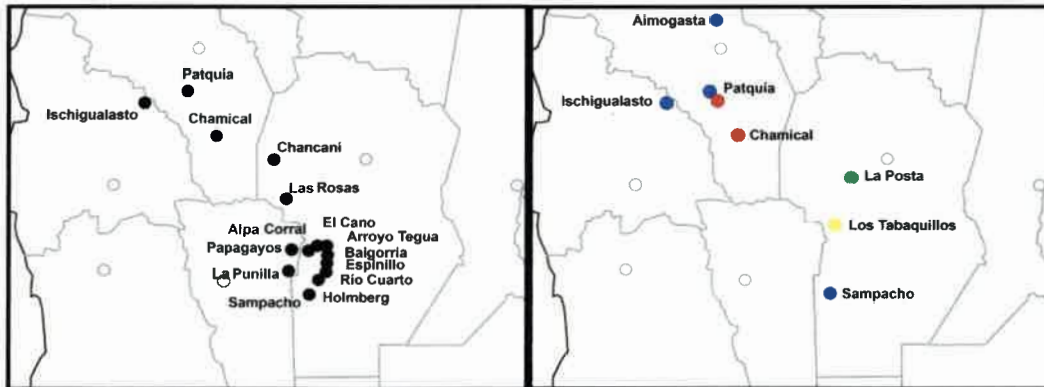


Figura 2: Localidades de muestreo en el área central de Argentina de las diferentes especies del género *Pleurodema* comprendidas en este trabajo. Con círculos negro se indican las localidades de *Pleurodema tucumanum*, con círculos azules las localidades de *Pleurodema nebulosum*, con círculos rojos las localidades de *Pleurodema guayapae*, con círculos verdes las localidades de *Pleurodema kriegi* y con círculo amarillo la localidad de *Pleurodema cordobae*.

Las localidades de muestreos, según la ecorregión a la que pertenecen y las características propias del lugar, fueron agrupadas en cuatro sectores. De esta manera, según su ubicación geográfica, las localidades de Papagayos, La Punilla, Sampacho, Holmberg, Río Cuarto, Espinillo, Baigorria, Arroyo Tegua, Alpa Corral y El Cano pertenecen al sector denominado “Espinal en ecotono con la Llanura Pampeana”. Por otro lado, las restantes localidades pertenecen a la ecorregión del Chaco Seco, que a su vez fueron denominadas como los sectores “Chaco Árido” (Chamical, Patquia, Chancaní y Las Rosas), “Chaco Serrano” (Pampa de Achala y Sierra de Comechingones) y “Chaco Árido en ecotono con el Monte” (Ischigualasto y Aimogasta).



Sector 1: Espinal en ecotono con la Llanura Pampeana

El Espinal se extiende desde el centro de Corrientes y norte de Entre Ríos hasta el centro de La Pampa y sudoeste de Buenos Aires formando un arco que atraviesa el centro de Santa Fe y Córdoba y gran parte de San Luis (Fig. 1). Esta ecoregión representa, en casi toda su extensión, una fisonomía en la que se combinan parches de bosque con pastizales y, en ocasiones, con comunidades palustres. El Espinal suele definirse como un Chaco empobrecido (Cabrera, 1971), es decir, sin quebrachos, siendo su vegetación dominante el bosque xerófilo formado por especies del género *Prosopis* (algarrobos, caldén y ñandubay) junto a talas, chañares, espinillos y ombúes. En algunas zonas particulares también aparecen palmares de Yatay. El Espinal rodea a la región pampeana por el norte, el oeste y el sudoeste y cubre llanuras y serranías bajas con un clima cálido y húmedo en el norte y más seco en el sur (Arturi, 2006). Por otro lado, las Llanuras pampeanas constituyen el más importante ecosistema de praderas de Argentina (Fig. 1). Poseen un relieve relativamente plano, con una suave pendiente hacia el Océano Atlántico. Una buena parte de la pradera pampeana está expuesta a anegamientos permanentes o cíclicos (Viglizzo *et al.*, 2006).

Los ambientes muestreados en este área corresponden principalmente a lagunas semipermanentes y charcas temporarias originadas posterior a lluvias abundantes. Los cuerpos de agua se formaron en depresiones de caminos (Fig. 3a), alcantarillas, escurrimientos dentro de zonas anegadas (Fig. 3b) o desborde de arroyos (Fig. 3c) y en general eran de pequeño tamaño (menor a 30 mts²).

En estos sitios se muestrearon poblaciones correspondientes a las especies *P. tucumanum* y *P. nebulosum*. En general, los machos tanto de *P. nebulosum* como de *P. tucumanum* se encontraban cantando dentro del agua, flotando, desde las primeras horas del crepúsculo hasta las últimas horas de la madrugada. En algunas ocasiones, donde la temperatura ambiental era alta, los machos también emitían los cantos desde fuera del agua (Fig. 4).

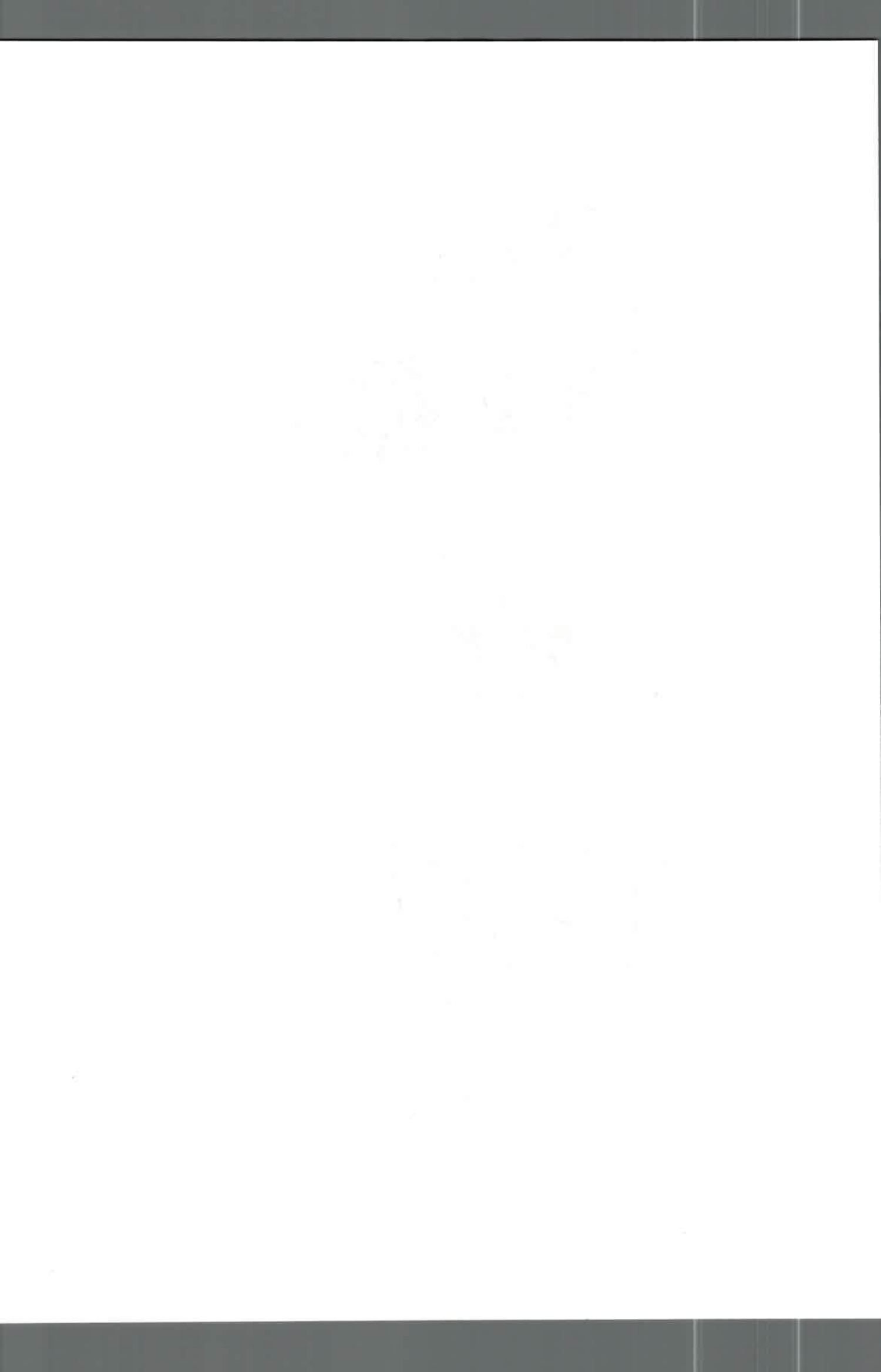




Figura 3: Ambientes característicos del sector “Espinal en ecotono con la Llanura Pampeana” utilizados por las diferentes poblaciones de *Pleurodema* para reproducirse. a) Charca temporaria sobre un camino perpendicular a la Ruta Nacional 8 en el Km. 651.5. b) Charca semipermanente originada por escurrimiento del agua de lluvia, Ruta Nacional 36, Km. 625. c) Charcas semipermanentes originadas por el desborde del arrollo Tegua, Ruta Nacional 36, Km. 649.



Figura 4: Individuo de *Pleurodema tucumanum* cantando desde el borde de una laguna temporaria (Fig. 3a). Ruta nacional 8, Km. 651.5; 28 de Noviembre de 2009. 22:20 hs. Temperatura del sustrato 29°C.



Chaco Seco

El Chaco Seco abarca las provincias de Salta, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Luís y Córdoba (Fig. 1). El clima es cálido y húmedo en el sector oriental y cálido y seco en el occidental. Cubre llanuras de poca elevación. Su vegetación dominante es el bosque xerófilo dominados por el quebracho blanco y quebracho colorado, con un segundo estrato de algarrobos, arbustos, cactáceas y gramíneas. Según sus condiciones climáticas se pueden distinguir tres subregiones, el Chaco Semiárido al Norte, El Chaco Árido hacia el Sudoeste y el Chaco Serrano en el límite oeste del Chaco Seco (Torrella & Adámoli, 2006).

Sector 2: Chaco Árido

Las localidades de Chamental, Patquía, Chancaní y Las Rosas ocupan la porción central del Chaco Árido. Esta región abarca el este de Catamarca y La Rioja, el norte de San Luís, 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, y la evapotranspiración es superior al aporte de agua. Esto origina un fuerte proceso de evaporación, que saliniza los suelos y llega a formar salinas. 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* spp.). En los suelos altos menos salinos aparece el bosque xerófilo característico de la región, incluso con el quebracho colorado (Torrella & Adámoli, 2006).

Los ambientes muestreados en este área corresponden a lagunas permanentes producto de represas artificiales como reservorios de agua (Fig. 5a) y charcas temporarias originadas posterior a lluvias relativamente abundantes para la zona. El tamaño de las lagunas permanentes oscilaba entre 2.500 y 10.000 mts², en tanto que las charcas temporarias en general eran pequeñas (menos a 50 mts²) y se formaban en zonas bajas donde escurre el agua de lluvia (Fig. 5b), alcantarillas (Fig. 5c) y desborde de ríos (Fig. 5d).



En los ambientes con presencia de charcas temporarias se muestrearon poblaciones de *P. tucumanum*, *P. nebulosum* y *P. guayapae*, en tanto que en las lagunas permanentes solo se encontró activa acústicamente a *P. tucumanum*. En general, los machos de las especies muestreadas en esta zona emitían los cantos desde el interior de los cuerpos de agua, flotando (Fig. 6a) o desde el borde (Fig. 6b), desde las primeras horas del crepúsculo hasta las últimas horas de la madrugada. También se encontraron machos de *P. guayapae* cantando desde el exterior de las charcas (Fig. 6c). Los amplexos de esta especie en general se encontraban dentro del agua, aunque también se encontraron en el exterior de las charcas (Fig. 6d).



Figura 5: Ambientes característicos del sector “Chaco Árido” utilizados por las diferentes poblaciones de *Pleurodema* para reproducirse. a) Laguna permanente: Represa privada en cercanías a la localidad de Patquía, La Rioja. b) Charca temporaria originada por escurrimiento del agua de lluvia, cruce entre las Rutas Nacionales 38, 74 y 150. Patquía, La Rioja. c) Alcantarilla ubicada en el Km. 350 de la Ruta Nacional 38, en cercanías a la localidad de Patquía, La Rioja. d) Charcas temporarias originadas por el desborde del Río Colorado, Ruta Nacional 74. Km. 357.5, en cercanías a la localidad de Patquía, La Rioja.

... ..

...

...

...

...

... ..

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...



Figura 6: Individuos de *Pleurodema guayapae* y *P. tucumanum* en actividad reproductiva. a) Individuo macho de *P. guayapae* cantando desde el interior de la laguna. b) Individuo macho de *P. tucumanum* cantando desde el borde interno de la laguna. c) Individuo macho de *P. guayapae* cantando desde el exterior de la charca. d) Amplexo de *P. guayapae* en el exterior de la laguna.



Sector 3: Chaco Serrano

La subregión del Chaco Seco posee 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* y aparecen céspedes de *Alchemilla pinnata* (Bridarolli & di Tada, 1994; Torrella & Adámoli, 2006).

La Sierra Grande de Córdoba está formada por La Sierra de Comechingones en su parte sur y por la Sierra de Achala en su parte norte (Miró 1999; Ramos 1999). Los procesos tectónicos y la actual morfología de la Sierra Grande favoreció el aislamiento topográfico y debido al proceso de especiación alopátrica produjo una flora y fauna endémica (Cei, 1972). Esta región se caracteriza por tener un clima templado-húmedo con nevadas en invierno. La precipitación media anual es de 800-900 mm. distribuidos principalmente en primavera-verano (Capitanelli, 1979).

En esta zona se muestrearon poblaciones de *P. kriegi* y *P. cordobae*. El ambiente tanto en la Pampa de Achala como en la Sierra de Comechingones fue muy similar. Las agregaciones reproductivas se encontraron en lagunas semipermanentes en los pastizales de altura (Fig. 7a y b). Son lagunas de contorno muy marcado, con profundidades entre los 10 y 40 cm. y el fondo de las mismas suele ser la roca madre misma. Las lagunas se encuentran rodeadas de céspedes de *Alchemilla pinnata* y pajonales de *Poa stuckertii* hasta el borde de las mismas (Fig. 7c y d). Los machos emiten sus cantos de advertencia desde las últimas horas del atardecer hasta las 3:00 horas de la madrugada siguiente, generalmente flotando semisumergidos en el agua entre los pajonales que caen dentro de las lagunas (Fig. 8).



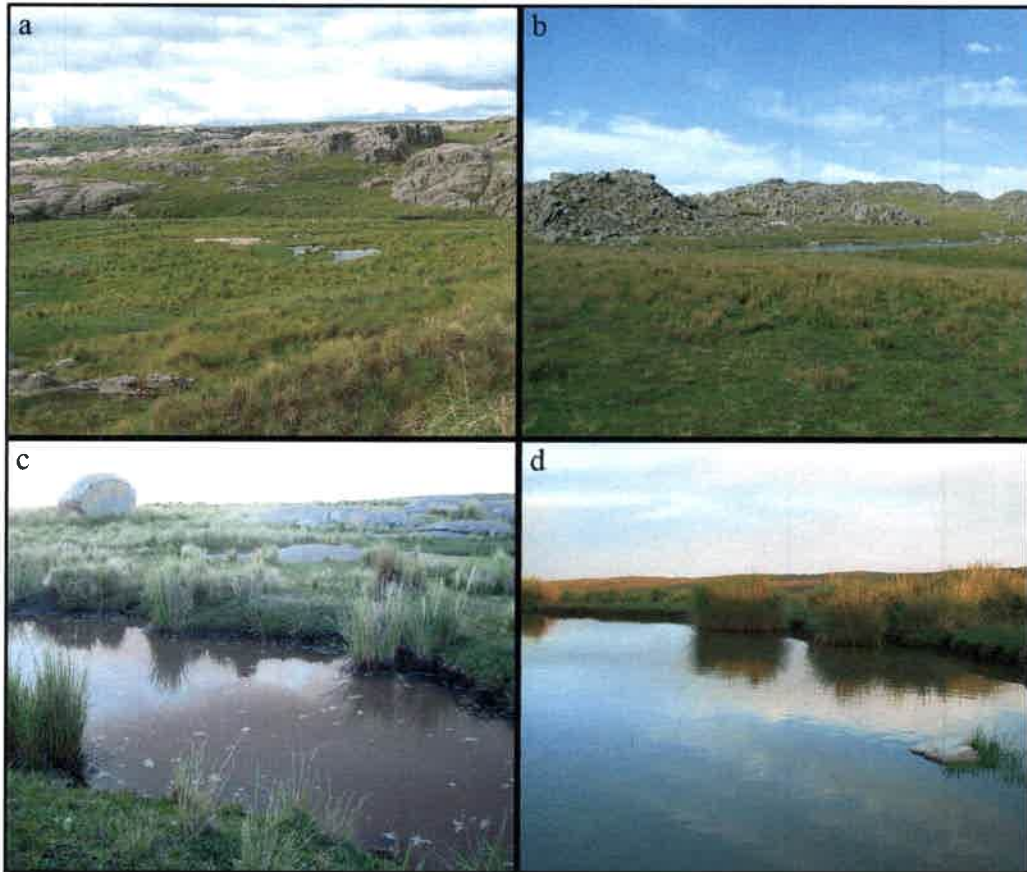


Figura 7: Ambientes característicos de la zona alta de las Sierras de Córdoba, caracterizado por un pastizal de altura. a) Vista panorámica del ambiente en Pampa de Achala, Córdoba. b) Vista panorámica del ambiente en Sierra de Comechingones, Córdoba. c) Laguna típica utilizada por *Pleurodema kriegi* para desarrollar sus actividades reproductivas, La Posta, Pampa de Achala, Córdoba. d) Laguna típica utilizada por *Pleurodema cordobae* para desarrollar sus actividades reproductivas, *Terra tipica* de *P. cordobae*, Sierra de Comechingones, Córdoba.



Figura 8: Individuo de *Pleurodema cordobae* cantando flotando desde el interior de una laguna (Fig. 7d). *Terra tipica* de *P. cordobae*, Sierra de Comechingones, Córdoba; 30 de Enero de 2008. 21:30 hs. Temperatura del agua 19.3°C.



Sector 4: Chaco Árido en ecotono con el Monte

La región del Monte se extiende desde Salta y Jujuy en forma de faja al este de la cordillera de los Andes hasta Río Negro y Chubut donde llega hasta el Océano Atlántico (Fig. 1). Según sus características geomorfológicas se han descrito dos ecorregiones; 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 (Burkart *et al.*, 1999). El clima es cálido y seco, con gran amplitud térmica diaria y entre estaciones (Cabrera, 1976) y la aridez, junto a su composición florística y faunística, son bastante homogéneas en toda su extensión. Las precipitaciones se concentran en los meses de verano y generalmente no superan los 200 mm anuales (Lopez de Casenave, 2001). El tipo de vegetación predominante es la estepa arbustiva alta compuesta principalmente por jarillales de *Larrea*, con presencia de cactáceas columnares o cardones y bosques de algarrobos en algunas zonas (Pol *et al.*, 2006).

Las poblaciones de *P. tucumanum* y *P. nebulosum* muestreadas en este sector se encontraban en charcas semipermanentes o temporarias con escasa o nula vegetación (Fig. 9). Los machos cantaban desde el interior de la laguna, flotando (Fig. 10) o sujeto a los bordes barrocos de las charcas.

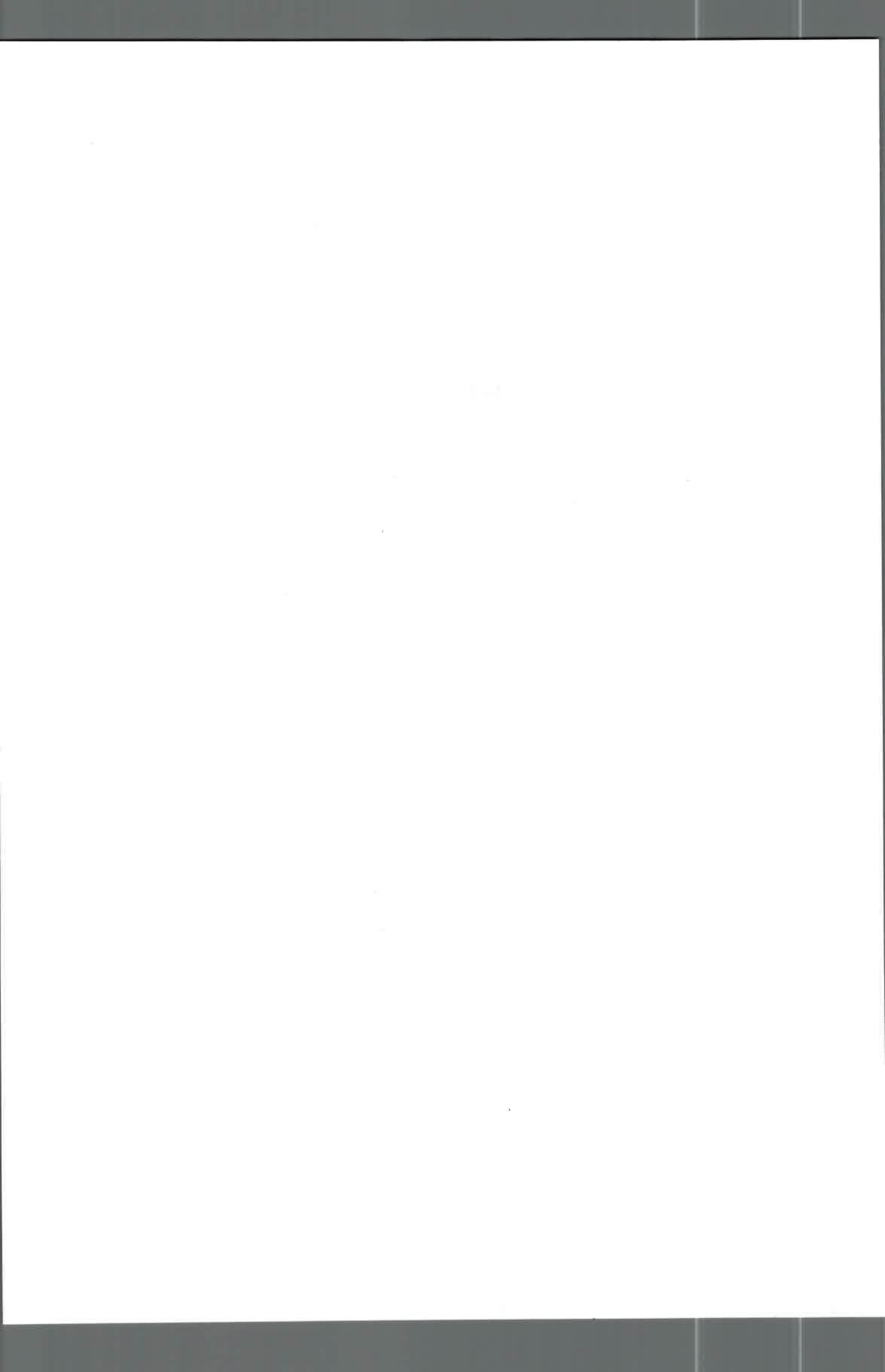


Figura 9: Laguna típica utilizada por *Pleurodema tucumanum* y *P. nebulosum* para desarrollar sus actividades reproductivas en el ambiente de Chaco-Monte presente en Ischigualasto, San Juan.





Figura 10: Individuo de *Pleurodema tucumanum* cantando flotando desde el interior de una laguna, Ischigualasto, San Juan; 21 de Diciembre de 2007. 22:30 hs. Temperatura del agua 19°C.



CAPÍTULO II: ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Pleurodema* DEL ÁREA CENTRAL DE ARGENTINA: CITOGENÉTICA Y ERITROMETRÍA

Introducción

Las especies animales y vegetales, por lo general, poseen un número total de cromosomas constante en sus células y éste puede variar considerablemente entre diferentes especies (Wurster & Benirschke, 1970; Morescalchi, 1973; Kuramoto, 1990; Macgregor, 1993; Hartl & Jones, 2002). El número total de cromosomas de las células somáticas de un individuo se identifica como $2n$, en tanto que el número gamético se expresa como n . En cada célula hay cromosomas que difieren entre sí, al conjunto de estos cromosomas diferentes se los denomina genomio o complemento cromosómico y al número de cromosomas que lo forman se denomina número básico (x). A su vez, cada cromosoma de una célula somática posee un cromosoma similar en morfología, tamaño y genes presentes, denominándose a éstos cromosomas homólogos.

La gran mayoría de las especies animales y vegetales son diploides, es decir, poseen dos complementos cromosómicos en sus células somáticas ($2x$) y por lo tanto sus gametas poseen un solo complemento (Lacadena, 1996). Por otro lado, existen muchos casos de entidades cuya dotación cromosómica normal presenta un número mayor de dos complementos cromosómicos y por ende, mayor número de cromosomas homólogos, denominándose poliploides a los individuos de estas especies (Winkler, 1916). A su vez, según el origen de estas especies poliploides, se pueden diferenciar aquellas que son autopoliploides de las alopoliploides. En el primer caso, todos los genomios provienen de una sola especie ancestral, en tanto que en el segundo se pueden encontrar genomios de dos o más especies diferentes (Tymowska, 1991).

Si bien la poliploidía es una fuerza evolutiva importante en algunos grupos de plantas (White, 1973; Lacadena, 1996; Otto & Whitton, 2000), éste mecanismo es menos frecuentes en animales vertebrados (Orr, 1990; Holloway *et al.*, 2006). A pesar de ello, la poliploidía en los anfibios anuros ya ha sido documentada en numerosas familias (Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Bogart, 1980; Kawamura, 1984; Kuramoto, 1990; Beçak & Beçak, 1998; Otto & Whitton, 2000; Martino & Sinsch, 2002; Stöck *et al.*, 2002; Rosset *et al.*, 2006).

La identificación de un individuo como poliploide solo puede asegurarse tras el estudio cromosómico del mismo, pero hay características fisiológicas, citológicas y/o morfológicas que permiten distinguir los individuos con diferentes grados de ploidía (Lacadena, 1996; Mable *et al.*, 2011). En el caso de las plantas, los individuos poliploides presentan un fenotipo gigas, resultando en un aumento de tamaño de todos sus órganos al poseer un mayor número de células que los individuos diploides. En cambio, este rasgo no se presenta en animales, ya que el tamaño de los individuos diploides y poliploides es similar (Lacadena, 1996) e incluso menor en los poliploides (Holloway *et al.*, 2006; Martino & Sinsch, 2002). Esto último se debe a que los órganos de los individuos poliploides están constituidos por células que poseen un mayor tamaño por ser de mayor ploidía, pero poseen un menor número de células que el de los diploides (Bogart, 1980).

En el caso puntual de los animales que poseen eritrocitos nucleados, entre los que se encuentran los anfibios anuros, el tamaño de los glóbulos rojos se encuentra estrechamente relacionado con el contenido de DNA (Stöck & Grosse, 1997). El tamaño de los eritrocitos varía dentro de las especies de anuros, y en general poseen un tamaño mayor al resto de los vertebrados (Zug *et al.*, 2001). Estas células poseen una forma elíptica y un gran núcleo generalmente central (Duellman & Trueb, 1986). El tamaño tanto de sus células como así también de sus núcleos ha permitido diferenciar a especies crípticas con diferentes niveles de ploidía (Matson, 1990; Martino & Sinsch, 2002; Rosset *et al.*, 2006; Grenat *et al.*, 2009; Valetti *et al.*, 2009). Por lo tanto, la morfometría de eritrocitos representa una herramienta eficiente que permite estimar, de forma indirecta, la ploidía en los anfibios anuros.

Mediante el proceso conocido como Meiosis, los individuos de reproducción sexual generan sus gametas que poseen la mitad de cromosomas que sus células somáticas. Durante esta división celular se producen dos eventos fundamentales que garantizan la variabilidad genética de las poblaciones; el apareamiento cromosómico y entrecruzamiento o *crossing over* de los cromosomas homólogos y la posterior segregación al azar de los mismos (Macgregor, 1993). El primer evento sucede al comienzo de la meiosis, más precisamente en la profase I y es en la diacinesis cuando se pueden observar los cromosomas más condensados y los quiasmas originados. El modo

en que se unen los cromosomas formando los quiasmas puede variar entre especies y fundamentalmente si se comparan especies de diferentes niveles de ploidía.

La poliploidización se ha manifestado en numerosas familias de anuros en forma independiente (Mable *et al.*, 2011). Dentro de la familia Leiuperidae, el género *Pleurodema* tiene la particularidad de presentar tres niveles de ploidía. De acuerdo a los estudios citogenéticos realizados hasta el momento, *P. kriegi* y *P. bibroni* poseen un complemento cromosómico tetraploide ($2n=4x=44$), *P. cordobae* es la única especie octoploide del género ($2n=8x=88$) y el resto de las especies conocidas son diploides ($2n=2x=22$) (Brum-Zorrilla & Sáez, 1968; Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Veloso *et al.*, 1972; Duellman & Veloso, 1977; Schmid *et al.*, 1993; Lourenço *et al.*, 2006; Valetti *et al.*, 2009). En cuanto a la eritrometría, ningún tipo de información ha sido presentada aún sobre este género.

El propósito de este capítulo es mostrar y discutir la variabilidad en cuanto al nivel de ploidía en las especies del género *Pleurodema* presentes en el área central de Argentina y determinar la configuración meiótica presente en cada una de ellas.

Materiales y Métodos:

Citogenética

Los individuos analizados fueron tratados con una inyección intraperitoneal de solución 0.3% de colchicina y la cantidad suministrada a cada individuo fue de 0.1 ml por cada 10 grs de peso del ejemplar. La solución de colchicina tiene por función inhibir la polimerización del huso mitótico (Saéz & Cardoso, 1978) pudiendo obtener una mejor calidad de las preparaciones y aumentar el número de metafases observadas. La solución de colchicina fue inyectada 12 hs. antes de sacrificar al individuo. El tiempo utilizado se debió a que tiempos más largos dan lugar a que los cromosomas se condensan, observándose redondeados, y tiempos más cortos permiten la observación de un menor número de metafases. Pasado este tiempo, los individuos fueron anestesiados y sacrificados mediante inmersión en un solución 1% de MS-222 (Pukhta & Blazhek, 2004). A continuación los individuos fueron diseccionados para extirparles el intestino y en el caso de los machos, también los testículos.

Los testículos se colocaron en cápsulas de petri y fueron macerado con solución hipotónica de Citrato de sodio 1% (peso/volumen). A continuación se colocó la solución del macerado con las células desprendidas en un tubo de centrifuga enrasando a 8 ml con la solución hipotónica durante 30 minutos. Ésta solución hipotónica provoca el aumento del volumen celular, de tal manera que los cromosomas detenidos en metafase se pueden observar como unidades separadas, obteniendo una mayor resolución de su morfología. En el caso del intestino, éste fue seccionado longitudinalmente y luego en trozos de 5 mm. para posteriormente ser colocado en una solución hipotónica de agua destilada por un lapso de 30 minutos. Culminada la etapa de hipotonía, el material procedente del macerado de testículo fue centrifugado durante 10 minutos a 1800 rpm para descartar el sobrenadante y fue resuspendido con solución de Carnoy (3:1 metanol-ácido acético) para ser fijados (Schmid, 1978). Lo que se busca con esta etapa es matar a las células sin deshidatarlas, y eliminar a la vez residuos citoesqueléticos (Carvajal *et al.*, 1995). En el caso del intestino, directamente se traspasaron los pequeños fragmentos de tejido a la solución de fijación.

Luego de dos horas se prepararon los extendidos con cromosomas sobre un portaobjetos. En el caso del material procedente del macerado de testículos se colocaron

dos gotas del material en fijador sobre los portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. En cambio, para preparar los extendidos con el material procedente de intestino se colocó sobre un portaobjeto un trozo de intestino fijado y mediante el uso de una micropipeta se succionó para permitir el desprendimiento de las células. Durante este paso el portaobjeto se encontraba a temperatura fría, de manera que al colocar el material sobre el mismo los cromosomas se expandieran y se pudieran observar posteriormente con menor superposición.

Luego del secado de los extendidos a temperatura ambiente, se realizaron las tinciones convencionales con Giemsa 10% en pH 6.8 buffer-fosfato. Finalmente, los preparados fueron montados en Bálsamo de Canada y cubiertos con un cubreobjeto. En la Tabla 2 se detalla el número de células en diacinesis y metafases obtenidas.

Tabla 2: Número de células en diacinesis y metafases analizadas en las diferentes especies de *Pleurodema* consideradas.

Especie	# diacinesis analizadas	# metafases analizadas	# Individuos analizados
<i>Pleurodema tucumanum</i>	94	5	15
<i>Pleurodema guayapae</i>	72	-	5
<i>Pleurodema nebulosum</i>	54	-	7
<i>Pleurodema kriegi</i>	64	22	4
<i>Pleurodema cordobae</i>	242	39	15
Total	526	66	43

Los extendidos fueron analizados con microscopio Zeiss Axiophot-Axiolab, fotografiados mediante video-cámara Sony™ DXC-950P Power HAD 3CCD Color y almacenados en archivos TIFF. La confección de los cariotipos de los individuos de cada población analizada fueron estudiados y reelaborados desde los archivos fotográficos obtenidos mediante el uso de un programa de manejo de imágenes (Adobe® Photoshop™ CS2).

Eritrometría

A un total de 232 individuos colectados (Tabla 3) se les extrajo una muestra de sangre mediante la punción de la vena angularis (Nöller, 1959). Inmediatamente se prepararon los correspondientes frotis en portaobjetos, los cuales fueron secados a temperatura de laboratorio. En cada frotis, se midió el eje mayor y menor a 15 eritrocitos aleatoriamente seleccionados (Fig. 11) mediante el uso de un microscopio Zeiss Axiophot-Axiolab. Debido a la morfología general de los eritrocitos de los anfibios anuros, se asumió la forma de elipse y se calcularon sus áreas mediante la fórmula del área de un elipse ($AB\pi/4$, donde **A** y **B** corresponden a los ejes mayor y menor, respectivamente) para luego obtener las áreas promedios por individuo (Martino & Sinsch, 2002).

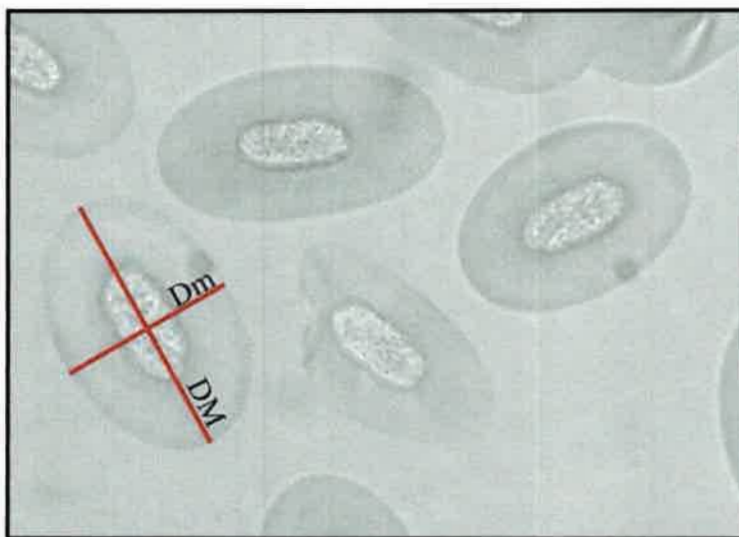


Figura 11: Variables medidas para el cálculo de área de un eritrocito. Distancia mayor (DM) y distancia menor (Dm).

Con el objeto de evaluar si el tamaño del eritrocito covaría con el tamaño corporal, se realizaron análisis de correlación entre dichas variables. El largo hociclo-cloaca (SVL) fue relevado *in vivo* en los 232 individuos mediante el uso de un calibre digital Mahr 16ES precisión 0.01 mm. Previamente al análisis de correlación se probó la normalidad de los datos mediante la prueba de asimetría y curtosis de Shapiro-Wilks.

Para evaluar posibles diferencias en el tamaño de los eritrocitos entre especies se realizaron comparaciones mediante ANOVA y test a posteriori (Bonferroni). En todos los análisis estadísticos realizados se utilizó un nivel de significación del 5%.

Tabla 3: Número de individuos examinados de las diferentes especies de *Pleurodema* estudiadas mediante Eritrometría.

Especie	# Individuos analizados	# Total analizados	Localidad	Provincia
<i>Pleurodema tucumanum</i>	6	98	Espinillo	Córdoba
	17		Holmberg	Córdoba
	20		Arroyo Tegua	Córdoba
	4		Sampacho	Córdoba
	1		Las Rosas	Córdoba
	5		Chancaní	Córdoba
	1		Ischigualasto	San Juan
	3		Papagayos	San Luis
	27		Patquía	La Rioja
	14		Chamical	La Rioja
<i>Pleurodema guayapae</i>	52	53	Patquía	La Rioja
	1		Chancaní	Córdoba
<i>Pleurodema nebulosum</i>	10	21	Ischigualasto	San Juan
	1		Sampacho	Córdoba
	10		Patquía	La Rioja
<i>Pleurodema kriegi</i>	25	25	La Posta, Pampa de Achala	Córdoba
<i>Pleurodema cordobae</i>	35	35	Extremo norte de la Sierra de Comechingones	Córdoba
Total	232	232	12 localidades	

Resultados

Pleurodema tucumanum Parker, 1927

Citogenética

El cariotipo de *Pleurodema tucumanum* se confeccionó trabajando cinco metafases en dos individuos de la población de La Punilla, San Luis (Tabla 2; Fig. 12). El nivel de ploidía determinado para la especie *P. tucumanum* corresponde a $2n=2x=22$ ($n=94$ Diacinesis y 5 Metafases en 15 individuos, Tabla 2).

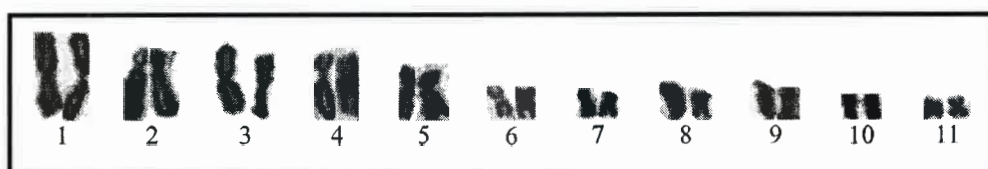


Figura 12: Cariotipo de *Pleurodema tucumanum*, La Punilla, San Luis ($2n=2x=22$).

El análisis de las diacinesis permitió determinar que todas las poblaciones de *Pleurodema tucumanum* forman 11 anillos bivalentes (94 diacinesis en 15 individuos) (Fig. 13).

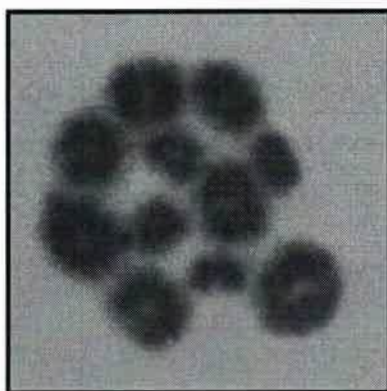


Figura 13: Diacinesis de *Pleurodema tucumanum*, Las Rosas, Córdoba ($2n=2x=22$).

Eritrometría

El tamaño de los eritrocitos en *P. tucumanum* (Fig. 21, en comparación entre especies) mostró una distribución normal ($W = 0.987457$, $p = 0.8873$, $n = 98$). La correlación entre el tamaño de los eritrocitos y el tamaño corporal en los individuos de *P. tucumanum* resultó significativa, con una probabilidad de rechazo cercana al límite de significación utilizado de 0.05 ($r = 0.2010$, $p = 0.0472$). El modelo de regresión lineal resultante fue el siguiente:

$$\text{Área de Eritrocito} = 127.007 + 0.803933 \cdot \text{SVL}.$$

El test para las normalidad de los datos luego de ajustarlos al SVL promedio de la especie (33.78 mm) también indicó una distribución normal ($W = 0.984657$; $p = 0.77249$)

En la Tabla 4 se muestra el valor medio y desvío estándar del área de eritrocito de los individuos analizados.

Tabla 4: Promedio, desvío estándar y rango del área de eritrocito (μm^2) en *Pleurodema tucumanum* estandarizados al SVL promedio de la especie (33.78mm).

	Media \pm desvío estándar	n
	Rango	
Área de eritrocitos	154.12 \pm 10.90 (120.46 – 182.02)	98

n: individuos analizados



***Pleurodema guayapae* Barrio, 1964**

Citogenética

Las 72 diacinesis estudiadas, de los 5 individuos analizados (Tabla 2) mostraron en su totalidad 11 anillos bivalentes (Fig. 14), permitiendo determinar la condición diploide de la especie ($2n=2x=22$).

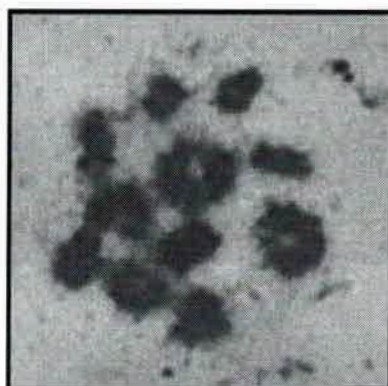


Figura 14: Diacinesis de *Pleurodema guayapae*. Patquía, La Rioja ($2n=2x=22$).

Eritrometría

La distribución de las áreas de eritrocitos en *Pleurodema guayapae* (Fig. 21, en comparación entre especies) respondió a una distribución normal ($W = 0.97245$; $p = 0.4306$; $n = 53$). No se observó asociación entre el tamaño corporal y el área de los eritrocitos en los individuos de *Pleurodema guayapae* ($r = 0.147$; $p = 0.2969$). El resumen estadístico de las mediciones de los eritrocitos de los cincuenta y tres individuos de *P. guayapae* se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Media, desvío estándar y rango del área de eritrocito (μm^2) de *Pleurodema guayapae*.

	Media \pm desvío estándar	n
	Rango	
Área de eritrocitos	131.39 \pm 11.11 (102.73 – 153.49)	53

n: individuos analizados

Pleurodema nebulosum* (Burmeister, 1861)*Citogenética**

El análisis de las diacinesis permitió determinar que los individuos de las localidades de Ischigualasto, Patquía y Sampacho son diploides y forman 11 anillos bivalentes (54 diacinesis en 7 individuos, Tabla 2) (Fig. 15).

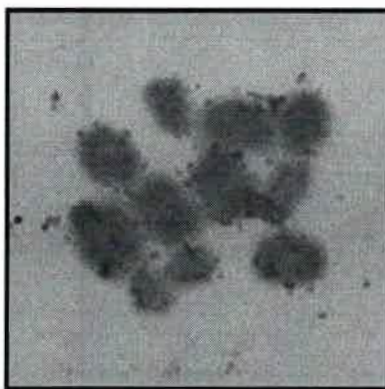


Figura 15: Diacinesis de *Pleurodema nebulosum*, Sampacho, Córdoba ($2n=2x=22$).

Eritrometría

Los datos referidos al tamaño de los eritrocitos en *Pleurodema nebulosum* (Fig. 21, en comparación entre especies) mostraron una distribución normal ($W = 0.928555$; $p = 0.1253$; $n = 21$). No se encontró asociación entre el tamaño corporal y el tamaño de los eritrocitos en *Pleurodema nebulosum* ($r = -0.082$, $p = 0.7236$). El resumen estadístico de las mediciones de los eritrocitos de los 21 individuos de *P. nebulosum* se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Media, desvío estándar y rango del área de eritrocito (μm^2) de *Pleurodema nebulosum*

	Media \pm desvío estándar	n
	Rango	
Área de eritrocitos	124.58 \pm 8,69 (106.22 – 147.36)	21

n: individuos analizados

***Pleurodema kriegi* (Müller, 1926).**

Citogenética

Fueron analizadas 22 metafases en cuatro individuos de *P. kriegi* (Tabla 2) y posteriormente se confeccionó el correspondiente cariotipo (Fig. 16). Los individuos de *Pleurodema kriegi* mostraron un complemento cromosómico tetraploide ($2n=4x=44$).



Figura 16: Cariotipo de *Pleurodema kriegi*, La Posta, Pampa de Achala ($2n=4x=44$).

El análisis de las diacinesis permitió determinar que los cromosomas de los individuos de *Pleurodema kriegi* forman 22 anillos bivalentes (64 diacinesis en 4 individuos, Tabla 2) sin observar variación en ninguno de los casos analizados (Fig. 17).

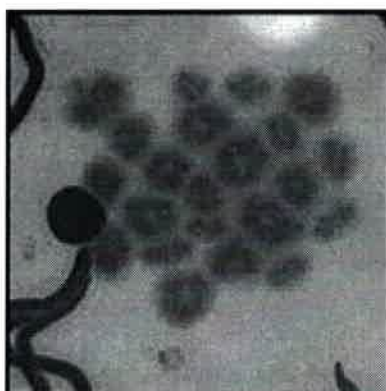


Figura 17: Diacinesis de *Pleurodema kriegi*, La Posta, Pampa de Achala, ($2n=4x=44$)

Eritrometría

El área de los eritrocitos en *Pleurodema kriegi* (Fig. 21, en comparación entre especies) mostró una distribución normal ($W = 0.980727$; $p = 0.893041$; $n = 25$). No se encontró asociación entre el tamaño corporal y el tamaño de los eritrocitos de los individuos de *Pleurodema kriegi* ($r = -0.119$, $p = 0.572$). En la Tabla 7 se muestra el resumen estadístico de las mediciones de eritrocitos en los 25 individuos de *Pleurodema kriegi* analizados.

Tabla 7: Media, desvío estándar y rango del área de eritrocito (μm^2) de *Pleurodema kriegi*.

	Media \pm desvío estándar	n
	Rango	
Área de eritrocitos	230.72 \pm 22.15 (185.50 – 284.19)	25

n: individuos analizados

***Pleurodema cordobae* Valetti, Salas y Martino, 2009.**

Citogenética

Los individuos de *Pleurodema cordobae* mostraron un complemento cromosómico octoploide ($2n=8x=88$). Los cariotipos correspondientes se armaron luego del análisis de 39 metafases de cuatro individuos de *P. cordobae* (tabla 2, Fig. 18).



Figura 18: Cariotipo de *Pleurodema cordobae*, Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, ($2n=8x=88$).

El análisis de las diacinesis permitió determinar que los individuos de *Pleurodema cordobae* exhiben variabilidad en el número de anillos y en el número de cromosomas en cada anillo (242 diacinesis en 15 individuos). El número de anillos que se forman en la diacinesis es variable, observándose figuras bivalentes, tetravalentes, hexavalentes y octavalentes. Sin embargo, en la mayoría de los casos el apareamiento de los cromosomas origina 26 configuraciones: un octavalente, 15 tetravalentes y 10 anillos bivalentes (Fig. 19).

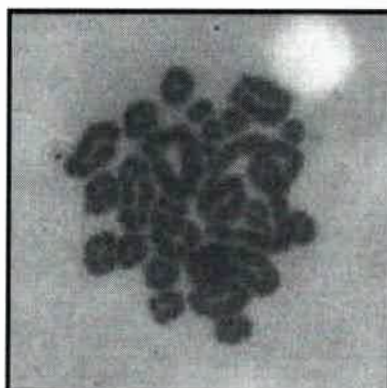


Figura 19: Diacinesis de *Pleurodema cordobae*, Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, ($2n=8x=88$).

Eritrometría

El área de los eritrocitos en *Pleurodema cordobae* (Fig. 21, en comparación entre especies) mostró una distribución normal ($W = 0.94216$; $p = 0.0907385$; $n = 35$). No se encontró asociación entre el tamaño corporal y el tamaño de los eritrocitos de los individuos de *Pleurodema cordobae* ($r = -0.037$, $p = 0.831$). En la Tabla 8 se muestra el resumen estadístico de las mediciones de los eritrocitos en los 35 individuos analizados.

Tabla 8: Media, desvío estándar y rango del área de eritrocito (μm^2) en *Pleurodema cordobae*.

	Media \pm desvío estándar	n
	Rango	
Área de eritrocitos	320.85 \pm 23.68 (267.35 – 357.88)	35

n: individuos analizados

Eritrometría comparativa entre especies

El tamaño de los eritrocitos resultó significativamente diferente entre especies (ANOVA, $F = 1144.12$, g.l.= 4/227, $p < 0.0001$) y las pruebas *a posteriori* de Bonferroni indicaron la presencia de cuatro grupos (Tabla 9, Figs. 20 y 21). Un grupo conformado por *P. guayapae* y *P. nebulosum* (diploides) y las tres especies restantes como grupos separados

Tabla 9: Test de Bonferroni para comparar el tamaño de los eritrocitos en las diferentes especies de *Pleurodema*.

Comparación de especies	Diferencia de medias	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
<i>P. tucumanum</i> – <i>P. guayapae</i>	*22.731	15.536	29.926
<i>P. tucumanum</i> – <i>P. nebulosum</i>	*29.536	19.389	39.683
<i>P. tucumanum</i> – <i>P. kriegi</i>	*-76.606	-86.061	-67.152
<i>P. tucumanum</i> – <i>P. cordobae</i>	*-166.737	-175.046	-158.428
<i>P. guayapae</i> – <i>P. nebulosum</i>	6.805	-4.075	17.686
<i>P. guayapae</i> – <i>P. kriegi</i>	*-99.337	-109.576	-89.099
<i>P. guayapae</i> – <i>P. cordobae</i>	*-189.468	-198.659	-180.277
<i>P. nebulosum</i> – <i>P. kriegi</i>	*-106.143	-118.634	-93.652
<i>P. nebulosum</i> – <i>P. cordobae</i>	*-196.273	-207.921	-184.625
<i>P. kriegi</i> – <i>P. cordobae</i>	*-90.130	-101.180	-79.081

* grupos significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

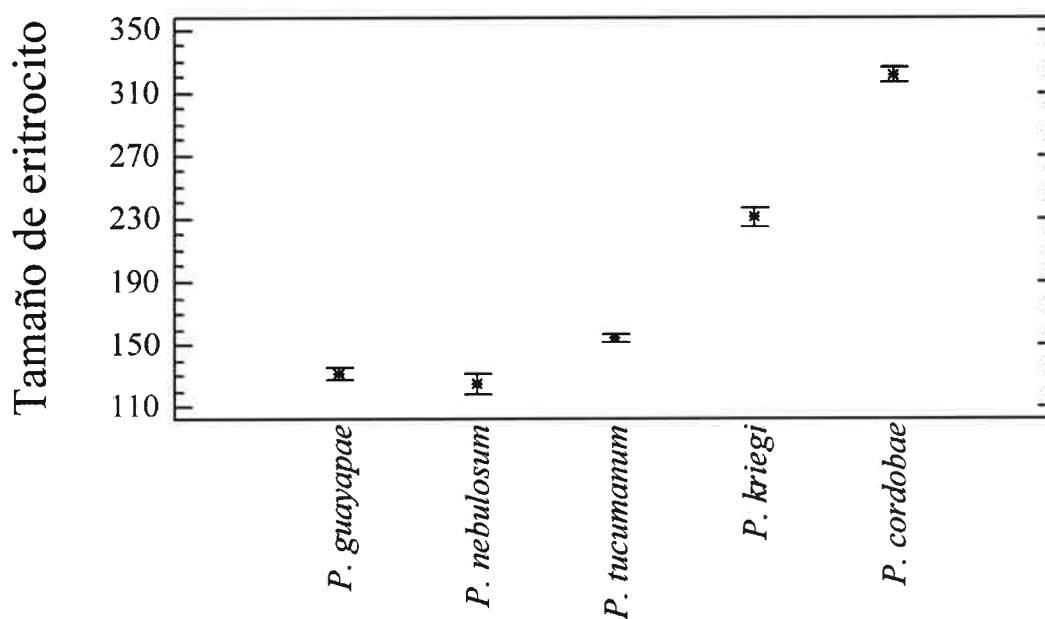


Figura 20: Tamaño de los eritrocitos para las cinco especies de *Pleurodema* estudiadas. Se muestra la media (asterisco) y el intervalo de confianza de Bonferroni de 95%.

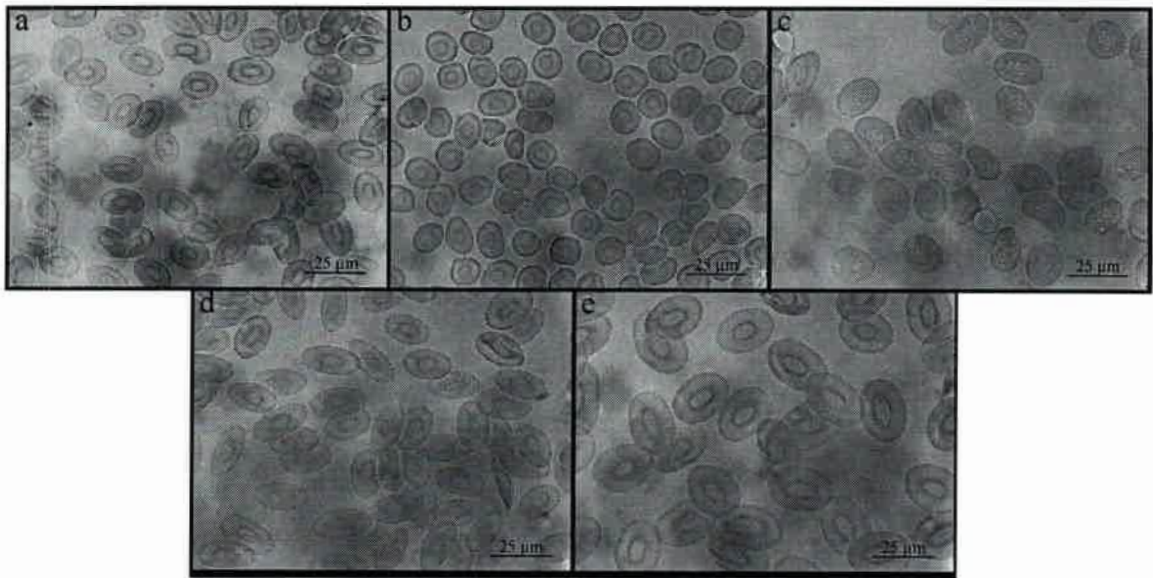


Figura 21: Eritrocitos de las especies estudiadas. a) *P. tucumanum* (diploide), b) *P. guayanae* (diploide), c) *P. nebulosum* (diploide), d) *P. kriegi* (tetraploide), e) *P. cordobae* (octoploide)

Discusión

El complemento cromosómico o número básico de las especies de *Pleurodema* estudiadas fue de once ($n = 11$), como ya fuera mencionado por otros autores (Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Valetti, *et al.*, 2009). Este número básico es característico no sólo de este género (Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Duellman & Veloso, 1977; Lourenço *et al.*, 2006; Valetti, *et al.*, 2009), sino también de otros géneros afines (Morescalchi, 1973; Kuramoto, 1990; Tymowska, 1991; Schmid *et al.*, 1993; Lourenço *et al.*, 2006), demostrando que este patrón, bastante homogéneo, está evolutivamente conservado en este grupo. Del mismo modo, el nivel diploide hallado en las poblaciones de *Pleurodema tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum* concuerda con los estudios previos, al igual que lo referido al nivel tetraploide de *P. kriegi* (Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970). En cuanto a *P. cordobae*, se determinó la octoploidía en poblaciones del área norte de las Sierras de Comechingones y ésta fue la principal característica que llevó a considerar a dicha entidad como una especie diferente de *P. kriegi* (Valetti *et al.*, 2009).

El análisis citogenético realizado a las especies del género *Pleurodema* reveló la existencia de tres niveles de ploidía en las poblaciones analizadas. Si bien esta técnica no fue posible aplicarla a todos los individuos capturados, la técnica de eritrometría permitió inferir el nivel de ploidía de todos los individuos capturados (232 individuos). Además, la comparación del tamaño de los eritrocitos facilitó la identificación principalmente de *Pleurodema kriegi* (tetraploide) y *P. cordobae* (octoploide) que son morfológicamente crípticas. Esta técnica ya ha sido empleada para diferenciar ejemplares de especies crípticas con diferentes niveles de ploidía (Stöck & Grosse, 1997; Martino & Sinsch, 2002; Rosset *et al.*, 2006; Grenat *et al.*, 2009). Por otra parte, este método de identificación es sencillo, no requiere más equipamiento que un bisturí estilete y un portaobjeto, y lo más importante es que no requiere el sacrificio del individuo en estudio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este método con un alto nivel de precisión debe complementarse siempre con la citogenética, ya que la eritrometría es predictiva y no confirmativa (Matson, 1990).

Al realizar las comparaciones en cuanto al tamaño de los eritrocitos entre las cinco especies analizadas, cuatro fueron los grupos obtenidos, a pesar de contar con solo

tres niveles de ploidía diferente. Por lo tanto, el análisis citogenético concuerda parcialmente con lo obtenido mediante eritrometría. La separación de *P. kriegi* y *P. cordobae* como grupos separados se debe al nivel de ploidía diferente al resto. *Pleurodema tucumanum* posee un tamaño de eritrocito mayor a las demás especies diploides y menor a *P. kriegi* que posee un complemento cromosómico tetraploide, aunque la diferenciación respecto a las especies diploides no es tan notorio como con *Pleurodema kriegi* (Figs. 20 y 21). Las diferencias halladas en el mayor tamaño de eritrocitos de *P. tucumanum* respecto a las otras dos especies diploides podría deberse a un mayor contenido de DNA. Esta variación genómica ya fue reportada para otras especies del género por Schmid *et al.*, (1993) indicando que la cantidad de DNA nuclear en *P. brachyops* es 3.4 veces mayor al de *P. thaul*, a pesar de poseer el mismo grado de ploidía y mismo número cromosómico. Sin embargo, esta sugerencia debería ser testeada con estudios comparativos entre las especies determinando el tamaño del genoma de cada una de ellas.

El tamaño de los eritrocitos no se correlacionó con el tamaño corporal de los individuos en ninguna especie a excepción de *Pleurodema tucumanum*. Si bien en este caso la correlación fue significativa, el modelo mostró un ajuste débil ($r= 0.2010$, $p = 0.0472$). Grenat *et al.*, (2009b) demostraron que al considerar los estadios juveniles de *Odontophrynus americanus*, el tamaño de los eritrocitos se relaciona con el tamaño corporal según un modelo polinomial de segundo orden, indicando una variación ontogenética del tamaño celular. A pesar de ello, considerando en el análisis únicamente individuos adultos, el tamaño de los eritrocitos no parece asociarse al tamaño corporal. Por lo tanto, el tamaño de los eritrocitos en los individuos adultos de los anuros parecería depender en mayor medida del contenido de ADN que presenten, estando directamente correlacionado con el nivel de ploidía del individuo.

En muchas especies de anfibios los cromosomas en diacinesis se unen formando anillos bivalentes y esto es producto de la presencia de dos quiasmas terminales (Morescalchi, 1973). El análisis de las diacinesis permitió comprobar que los cromosomas en esta etapa de división celular se unen en forma bivalentes, tanto en las especies diploides como así también en *P. kriegi* (tetraploide), donde en lugar de mostrar 11 anillos tetravalentes mostró 22 anillos bivalentes en todos los casos analizados. Barrio & Rinaldi de Chieri (1970) interpretan estos mismos resultados desde

un origen aloploiploide de *P. kriegi*. Si bien proponen este origen, las especies que podrían haber originado a ésta no está definido y estos autores hipotetizan que una especie puede estar actualmente extinta y la otra ser *Pleurodema thaul*.

Una especie diploide con reproducción sexual debe tener un comportamiento meiótico normal para ser fértil, es decir, debe tener un buen apareamiento entre cromosomas homólogos y consecuentemente formación de bivalentes, determinando una correcta segregación y formación de gametos balanceados (Poggio & Naranjo, 2004). En las especies diploides analizadas aquí y en *Pleurodema kriegi* que es tetraploide, el comportamiento de los cromosomas en diacinesis responde a lo manifestado por Poggio & Naranjo (2004). Estos autores indican que en general y en presencia de genes normales que regulan fisiológicamente todas las etapas y procesos de la división meiótica, el grado de apareamiento meiótico es una medida de la homología que existe entre los cromosomas. Asumiendo el origen aloploiploide de *Pleurodema kriegi* propuesto por Barrio & Rinaldi de Chieri (1970) y teniendo en cuenta que en todos los casos analizados los cromosomas se unieron formando 22 anillos bivalentes, dos posibles explicaciones pueden ser dadas. En un caso, los genomas de las especies que dieron origen a *P. kriegi* son muy diferentes y por ende no aparecen tetravalentes en las configuraciones meióticas. La otra posible explicación sería en el caso en que las especies parentales de *P. kriegi* fuesen cercanas filogenéticamente. En este último caso, las configuraciones meióticas presentarían un alto número de multivalentes, pero si el proceso de diploidización se encuentra avanzado, los anillos bivalentes serían más frecuentes y habría un menor apareamiento entre cromosomas homeólogos (Poggio & Naranjo, 2004). Análisis filogenéticos aún no realizados en este grupo permitirían inferir a cuál de los casos mencionados respondería *P. kriegi*.

En el análisis de las diacinesis de *Pleurodema cordobae*, a diferencia de lo obtenido en las demás especies, los cromosomas no mostraron un patrón constante. Por el contrario, se observaron diferentes números de anillos en sus células con la presencia de configuraciones meióticas multivalentes, incluso se presentaron tales variaciones dentro del mismo individuo. Configuraciones multivalentes ya han sido descritas en varias especies poliploides de anuros (Beçak *et al.*, 1966, 1967, 1970; Schmid *et al.*, 1985, Salas & Martino, 2009) y están formadas por cromosomas homólogos. Trabajando con plantas, Poggio & Naranjo (2004) trataron con soluciones diluidas de

colchicina a plantas del género *Helianthus* y obtuvieron apareamientos homeólogos y formación de multivalentes en especies que, aunque tienen origen poliploide, cuando no se utiliza colchicina poseen meiosis regular con formación de bivalentes. Estos resultados estarían indicando que la colchicina induciría el apareamiento intergenómico, produciendo el mismo efecto de alelos mutantes de genes que controlan el apareamiento. Los resultados obtenidos en el comportamiento meiótico de *P. cordobae* podrían llevar a pensar en una situación semejante a la descrita. Sin embargo, el tratamiento premeiótico con colchicina empleado en este trabajo con la finalidad de obtener un mayor número de metafases, fue rigurosamente repetido en todas las ocasiones, con todas las especies analizadas. Por tal motivo, y al no observar en ninguna ocasión apareamientos homeólogos y formación de multivalentes en *P. kriegi*, el efecto de la colchicina no sería la causa de las formaciones multivalentes y comportamiento irregular en la meiosis de *P. cordobae*.

Poggio & Naranjo (2004) manifiestan que hay genes que pueden interferir con el proceso normal de apareamiento entre cromosomas homeólogos (formación del complejo sinaptonémico, ocurrencia y/o posición de sobrecruzamientos) con la consecuente formación de univalentes en su meiosis. Si bien en *P. cordobae* se observa un número alto de bivalentes y otras figuras (tetraivalentes y hexaivalentes), es llamativo la presencia constante de un anillo octavalente en las células en diacinesis y la ausencia de univalentes en todas las células analizadas. Para que los individuos de *P. cordobae* produzcan gametas fértiles, éstas deben estar balanceadas en el número cromosómico, de lo contrario las gametas serían infértiles. En referencia a esto último, Macgregor (1993) manifiesta que este problema podría ser resuelto por mecanismos que impidan la formación de multivalentes desiguales o bien, fortaleciendo la diploidización efectiva de la meiosis obteniendo solo bivalentes. Por lo expresado, los resultados obtenidos del análisis de las configuraciones meióticas de *P. cordobae* podrían estar indicando que las gametas formadas en esta especie tendrían una viabilidad baja. Sin embargo, las poblaciones de *P. cordobae* encontradas son bastantes numerosas y los escasos datos biológicos conocidos de la especie (Valetti *et al.* 2011) indicarían que estas poblaciones se están reproduciendo sin mayores problemas. Estudios futuros analizando en mayor detalle el comportamiento de los cromosomas en diacinesis en *P. cordobae* y evaluando la fertilidad en esta especie serán necesarios para conocer el motivo de este particular

modo en que se produce el apareamiento cromosómico en la etapa previa a la generación de las gametas de esta especie octoploide, resultando *P. cordobae* un interesante modelo para investigaciones genéticas.

Gregory & Mable (2005) expresaron que en los últimos años las asunciones tradicionales sobre la poliploidía animal han tambaleado ante nuevas evidencias y sus supuestas reglas están destinadas a ser modificadas. Por lo tanto y en coincidencia con lo expresado por Gregory & Mable (2005), “muchas sorpresas adicionales aparecerán en el estudio de la poliploidía animal – tantas como el esfuerzo hecho para encontrarlas–”.

CAPÍTULO III: ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Pleurodema* DEL ÁREA CENTRAL DE ARGENTINA

Introducción

Las poblaciones son las unidades operativas de la evolución, y como manifiestan Duellman & Trueb (1986), la morfología de estas poblaciones representan la interfase observable con su ambiente. Por lo tanto, el conocimiento de la estructura de un organismo es un prerrequisito para el entendimiento de sus relaciones filogenéticas, etológicas, y la relación con los aspectos bióticos y abióticos del ambiente.

La morfometría es un área fundamental de la investigación en Biología y estudia la descripción cuantitativa, el análisis e interpretación de la forma y la variación de la forma (Rohlf, 1990). En general, los estudios morfométricos han ocupado y siguen ocupando una gran parte de los estudios realizados en biología. Esto se debe a la gran información que brindan al comparar diferentes especies, poblaciones o incluso individuos. Por este motivo, las decisiones taxonómicas por un largo periodo de tiempo se tomaban basadas principalmente en aspectos morfológicos de los individuos. En la actualidad, los análisis morfométricos son muy importantes en los estudios taxonómicos y sistemáticos (Bernal & Clavijo, 2009), aunque complementado por otras áreas como la etología, la citogenética y la fisiología, entre otros.

En muchas especies, la morfología externa entre machos y hembras es diferente como consecuencia de la selección sexual. Este dimorfismo sexual, principalmente en el tamaño corporal, es un aspecto común en muchos anfibios anuros (Zug *et al.*, 2001) y estas diferencias intersexos pueden determinarse mediante estudios morfométricos.

Particularmente, los estudios morfométricos en el género *Pleurodema* no son muy abundantes, y principalmente se realizaron con el objeto de resolver algunas cuestiones taxonómicas (por ejemplo, Barrio, 1964; Gallardo, 1968; Laurent, 1969; Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Laurent, 1975; Duellman & Veloso, 1977; Barrio, 1977; Cei, 1980; McLister *et al.*, 1991; Baldo & Gutierrez, 1997; Kolenc *et al.*, 2009; Valetti *et al.*, 2009).

Debido a que la morfometría es una herramienta muy útil que permitiría analizar comparativamente los diferentes *taxa* de *Pleurodema* del área central del país, los objetivos en el presente capítulo son los siguientes: 1) Caracterizar morfométricamente cada especie analizada; 2) Indagar sobre el posible dimorfismo sexual en cuanto a la morfometría en las especies y 3) Analizar el grado de diferenciación morfométrica entre las especies analizadas.

Materiales y Métodos:

La morfometría de las diferentes especies de *Pleurodema* se caracterizó en base a 17 variables morfométricas según varios autores (Laurent, 1969; Barrio, 1977; Cei, 1980 y Heyer *et al.*, 1990), las cuales fueron relevadas *in vivo* en 255 individuos adultos en las cinco especies en estudio (Tabla 10). A continuación se mencionan las 17 variables (Fig. 2) relevadas mediante el uso de calibre digital Mahr 16ES precisión 0.01 mm: 1) Largo hocico-cloaca (SVL); 2) ancho de la cabeza (AC); 3) largo de la cabeza (LC); 4) distancia hocico-ojo (DH-O); 5) distancia internarinas (DN-N); 6) distancia interocular (DO-O); 7) distancia ojo-narina (DO-N); 8) distancia rostro-narina (DR-N); 9) diámetro del ojo (DO); 10) largo del brazo (LB); 11) largo del tercer dedo de la mano (L3Dm); 12) largo del fémur (LF); 13) largo de la tibia (LT); 14) largo del pie (LP); 15) largo del tercer dedo del pie (L3Dp); 16) largo del cuarto dedo del pie (L4Dp); 17) distancia mínima entre el borde posterior del tubérculo metatarsal interno y el borde de la membrana entre el tercer y cuarto dedo del pie (DTM-MI).

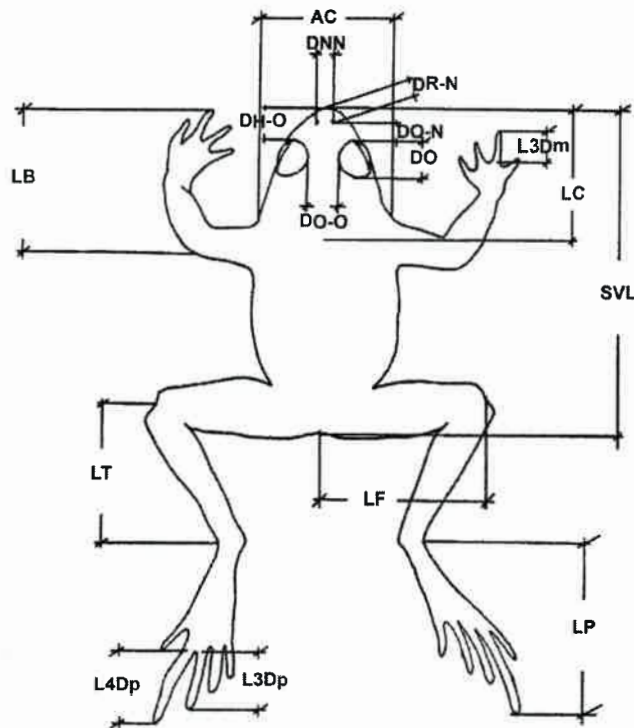


Figura 22: Variables morfométricas relevadas en los individuos adultos de las diferentes especies del género *Pleurodema* estudiadas. Ver abreviaciones en el texto.

Cada especie fue caracterizada mediante estadística descriptiva a través de la media y desvío estándar discriminada por sexos. Se probó la normalidad de los datos en las 17 variables mediante la prueba de asimetría y curtosis de Shapiro-Wilks. Posteriormente, en los casos que fue posible, se realizaron comparaciones entre sexo para evaluar si existen diferencias entre estas variables de clasificación mediante test t o Mann Whitney, según corresponda.

Posteriormente se procedió a realizar comparaciones interespecíficas. Para ello, primero se empleó un análisis de Componentes Principales con rotación varimax con la finalidad de explorar la variabilidad morfométrica dentro y entre especies y analizar la asociación de las variables clasificatorias respecto a los datos. Este método ortogonal de rotación reduce al mínimo el número de variables con cargas grandes en un factor, lo que mejora la capacidad de interpretación de los factores. La rotación no afecta las variaciones comunes ni el porcentaje de la varianza total explicada, sin embargo cambia el porcentaje de la varianza que explica cada factor.

Posterior al análisis exploratorio de los datos se realizaron Análisis Discriminantes para comparar las diferentes especies e identificar, en el caso que hubiere, aquellas variables clasificatorias para cada especie. Este análisis maximiza las diferencias entre las especies asignadas *a priori* cuantificando más solidamente la variación entre *taxa* (Dobson, 1983; Steel & Torrie, 1992).

Finalmente, debido a que los análisis multivariados permitieron identificar grupos de especies, se realizaron análisis univariados de todas las medidas morfométricas relevadas para evaluar la diferenciación entre las especies a nivel inter e intra grupos. Las comparaciones fueron realizadas de a pares mediante Mann-Whitney o test t según se haya rechazado la hipótesis de normalidad de los datos o no, respectivamente.

Todos los análisis fueron realizados mediante el uso del programa Statgraphics Plus 5.0 para Windows.

Los especímenes estudiados (Tabla 10) fueron fijados y preservados en alcohol 70% y depositados en la colección herpetológica de la cátedra de Ecología General, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba y en la colección herpetológica del museo de la Fundación Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán, Tucumán.)

Tabla 10: Número de individuos examinados de las diferentes especies de *Pleurodema* estudiadas mediante Morfometría.

Especie	# Individuos analizados	# Total analizados	Localidad	Provincia
<i>Pleurodema tucumanum</i>	6	109	Espinillo	Córdoba
	20		Holmberg	Córdoba
	21		Arroyo Tegua	Córdoba
	1		El Cano	Córdoba
	3		Sampacho	Córdoba
	2		Las Rosas	Córdoba
	7		Chancaní	Córdoba
	1		Ischigualasto	San Juan
	3		Papagayos	San Luis
	30		Patquía	La Rioja
	15		Chamical	La Rioja
<i>Pleurodema guayapae</i>	57	57	Patquía	La Rioja
<i>Pleurodema nebulosum</i>	11	22	Ischigualasto	San Juan
	1		Sampacho	Córdoba
	10		Patquía	La Rioja
<i>Pleurodema kriegi</i>	28	28	La Posta, Pampa de Achala	Córdoba
<i>Pleurodema cordobae</i>	39	39	Extremo norte de la Sierra de Comechingones	Córdoba
Total	255	255	15 localidades	

Resultados

Pleurodema tucumanum Parker, 1927 (Fig.23)



Figura 23: Foto de ejemplar macho adulto de *Pleurodema tucumanum*. Holmberg, Córdoba.

Los 109 individuos analizados de *Pleurodema tucumanum* correspondieron a 93 machos y 16 hembras. Las medias y desvíos estándar de las 17 variables morfométricas se muestran discriminadas por sexo en la Tabla 12.

Los resultados del test de Shapiro-Wilks (Tabla 11) fueron significativos en nueve variables, indicando que se rechaza la normalidad de los datos en dichas variables y se acepta la hipótesis de normalidad de los datos en las restantes variables donde los test resultaron no significativos. Por lo tanto, se realizaron las comparaciones entre sexo en las variables mediante test t o Mann-whitney según corresponda.

Todas las variables morfométricas mostraron diferencias altamente significativas entre sexos (Tabla 12), indicando un marcado dimorfismo sexual. En estos casos siempre las hembras mostraron un mayor valor que los machos.

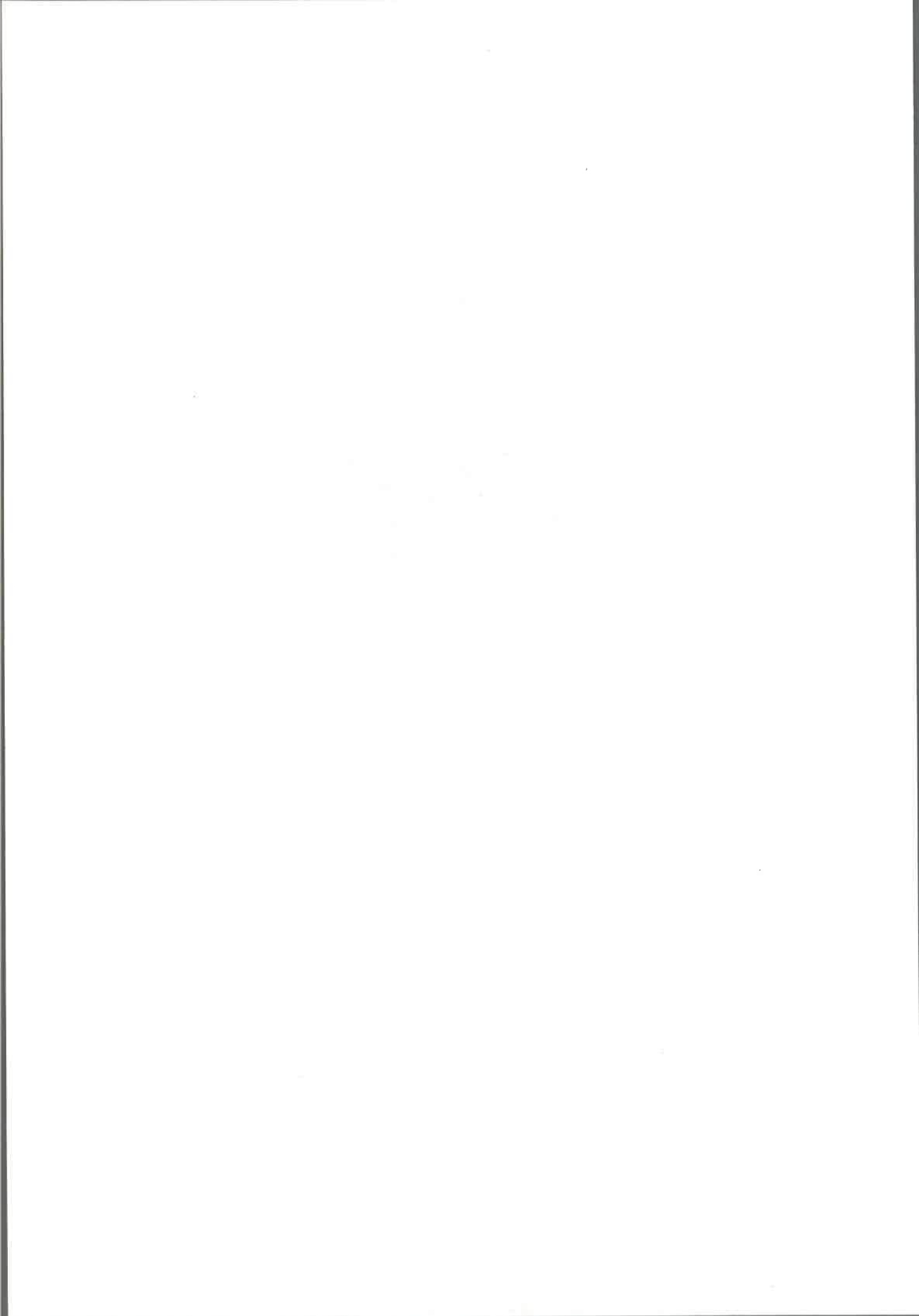


Tabla 11: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas tanto para machos (n=93) como para hembras (n=16) de *Pleurodema tucumanum* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).

Variable	machos		hembras	
	W	p	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.964015	0.0601	0.936072	0.3016
Ancho de la cabeza (AC)	0.961667	0.0397	0.966211	0.7447
Largo de la cabeza (LC)	0.943098	0.0009	0.942708	0.3776
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.959415	0.0262	0.857506	0.0171
Dist. internarinas (DN-N)	0.980956	0.5974	0.917275	0.1541
Dist. interocular (DO-O)	0.911915	0.0000	0.774202	0.0009
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.981776	0.6396	0.934865	0.2892
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.925465	0.0000	0.964647	0.7180
Diámetro del ojo (DO)	0.98552	0.8189	0.956439	0.5786
Largo del brazo (LB)	0.985507	0.8183	0.953743	0.5349
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.961054	0.0355	0.947639	0.4433
Largo del fémur (LF)	0.973508	0.2613	0.951491	0.4999
Largo de la tibia (LT)	0.954175	0.0095	0.871353	0.0283
Largo de la pata (LP)	0.955129	0.0115	0.842141	0.0098
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.985938	0.8361	0.885624	0.0478
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.965211	0.0738	0.92813	0.2282
DTM-MI	0.968345	0.1232	0.915549	0.1447

Tabla 12: Media y desvío estándar (mm) de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema tucumanum* y estadísticos del test *t* entre sexos para cada variable (o U de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales). *t* y U representan el estadístico, **p** la probabilidad, Se destacan las variables significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Variables	Promedio		Desvío Estándar		Test <i>t</i> o Mann-Whitney	
	m	h	m	h	<i>t</i> o U	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	32.21	37.86	2.32	2.37	-7.37	0.000
Ancho de la cabeza (AC)	12.96	14.97	0.93	0.73	<i>1437.0</i>	0.000
Largo de la cabeza (LC)	12.76	13.93	1.27	1.64	<i>1091.0</i>	0.003
Dist. hocico-ojo (DH-O)	5.23	5.82	0.51	0.54	<i>1114.5</i>	0.002
Dist. internarinas (DN-N)	2.52	2.65	0.25	0.24	-2.02	0.047
Dist. interocular (DO-O)	2.94	3.19	0.39	0.52	<i>996.0</i>	0.031
Dist. ojo-narina (DO-N)	2.70	3.03	0.27	0.37	-4.20	0.000
Dist. rostro-narina (DR-N)	3.07	3.40	0.34	0.43	<i>1096.0</i>	0.003
Diámetro del ojo (DO)	4.16	4.52	0.31	0.40	-4.13	0.000
Largo del brazo (LB)	13.48	15.09	0.92	1.06	-6.26	0.000
Largo del 3 dedo (L3Dm)	4.13	4.46	0.31	0.35	<i>1119.0</i>	0.001
Largo del fémur (LF)	13.71	15.11	1.07	0.68	-5.05	0.000
Largo de la tibia (LT)	14.10	15.57	0.81	0.76	<i>1323.0</i>	0.000
Largo de la pata (LP)	20.95	22.28	1.32	2.07	<i>1101.0</i>	0.002
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	7.47	8.01	0.49	0.90	<i>1124.5</i>	0.001
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	4.37	4.71	0.40	0.46	-3.07	0.003
DTM-MI	5.00	5.72	0.59	0.77	-4.28	0.000

m = machos (n = 93); h = hembras (n = 16)

***Pleurodema guayapae* Barrio, 1964 (Fig. 24)**



Figura 24: Foto de ejemplar macho adulto de *Pleurodema guayapae*. Patquía, La Rioja.

Los 57 ejemplares analizados de *Pleurodema guayapae* correspondieron a 40 machos y 17 hembras procedentes de la localidad de Patquía, La Rioja. Todas las variables morfométricas resultaron normales en cuanto a su distribución (Tabla 13). En la Tabla 14 se muestran las medias y desvíos estándar de las variables morfométricas y los resultados del test *t* de comparación de medias entre sexos de dichas variables. Ocho variables del total de 17, incluida el Largo hocico-cloaca, mostraron diferencias estadísticas entre sexos.

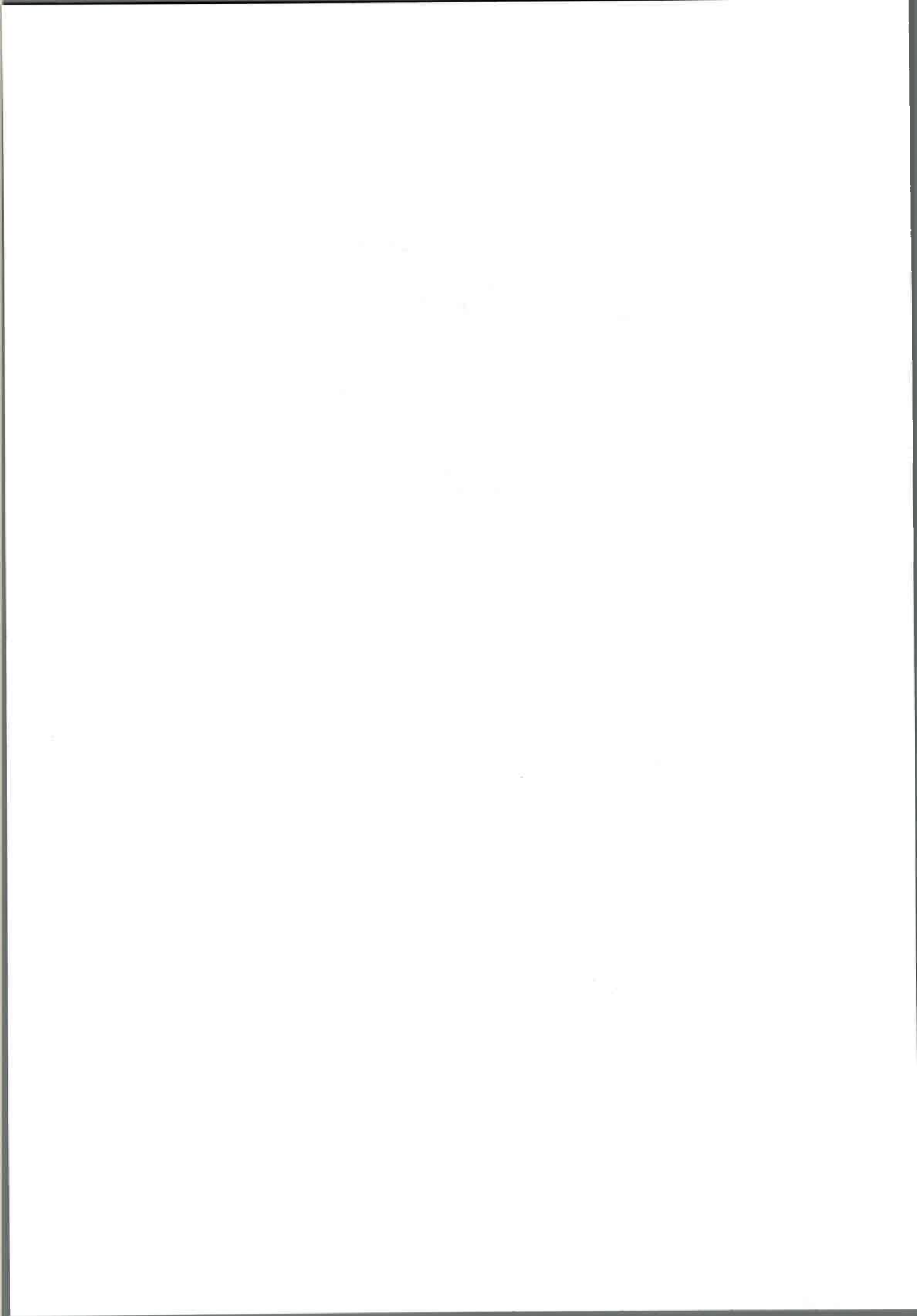


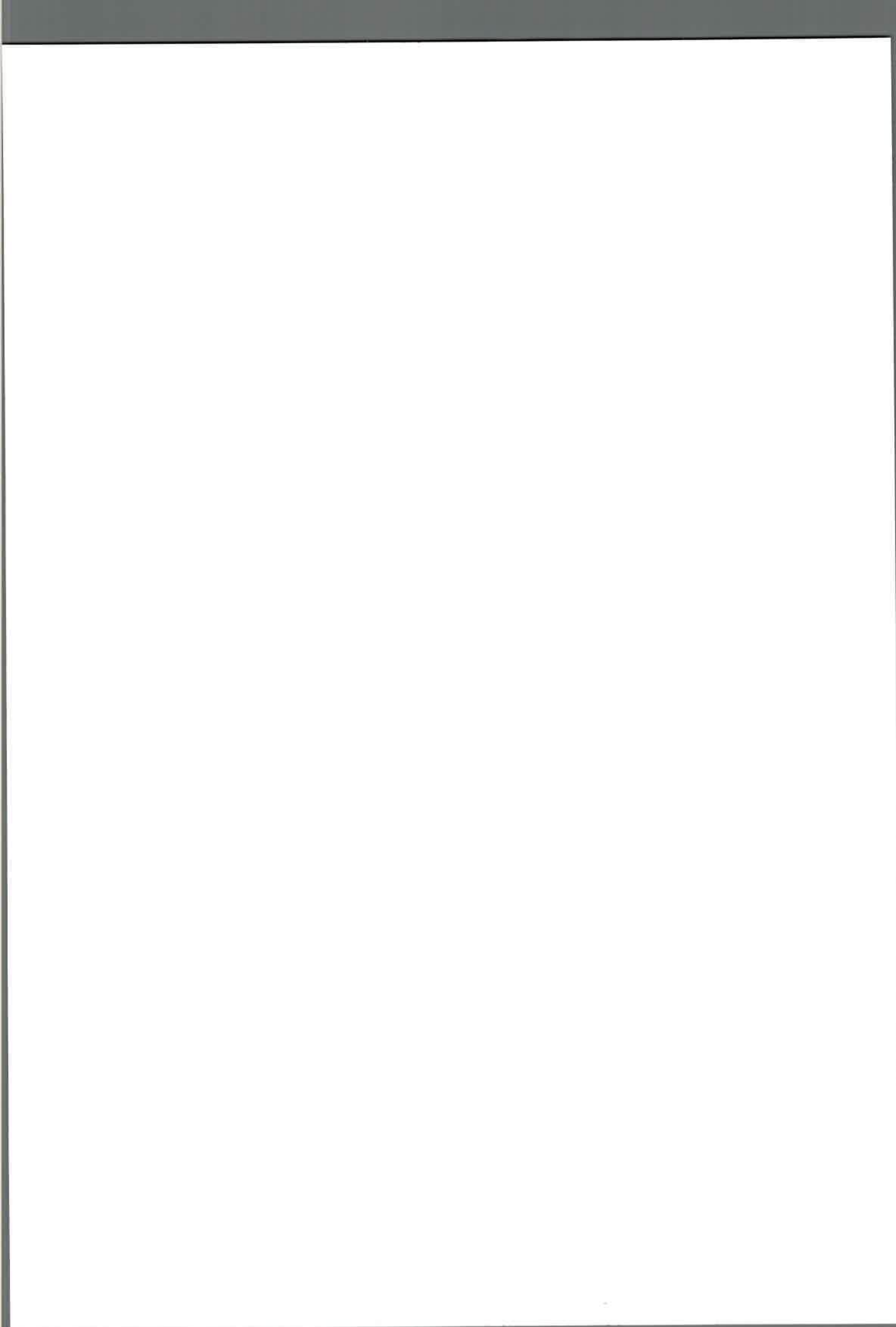
Tabla 13: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas tanto para machos (n=40) como para hembras (n=17) de *Pleurodema guayapae* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).

Variable	machos		hembras	
	W	p	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.987015	0.9521	0.912451	0.1119
Ancho de la cabeza (AC)	0.989123	0.9778	0.967807	0.7559
Largo de la cabeza (LC)	0.973774	0.5857	0.951416	0.4730
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.988428	0.9707	0.926308	0.1914
Dist. internarinas (DN-N)	0.965209	0.3427	0.937088	0.2867
Dist. interocular (DO-O)	0.940758	0.0504	0.928378	0.2071
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.976844	0.6855	0.909568	0.1000
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.981036	0.8164	0.953332	0.5032
Diámetro del ojo (DO)	0.984586	0.9073	0.939627	0.3145
Largo del brazo (LB)	0.974348	0.6042	0.919601	0.1478
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.969983	0.4691	0.90728	0.0914
Largo del fémur (LF)	0.98059	0.8033	0.958132	0.5836
Largo de la tibia (LT)	0.973722	0.5840	0.961598	0.6448
Largo de la pata (LP)	0.963158	0.2967	0.920938	0.1557
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.958211	0.2059	0.976288	0.8921
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.974513	0.6095	0.983519	0.9687
DTM-MI	0.980516	0.8011	0.969407	0.7839

Tabla 14: Media y desvío estándar (mm) de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema guayapae* y estadísticos del test *t* entre sexos para cada variable. *t* representa el estadístico, **p** la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes.

Variables	Promedio		Desvío Estándar		Test t	
	m	h	m	h	t	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	39.43	41.70	2.39	1.73	-3.56	0.001
Ancho de la cabeza (AC)	15.18	15.81	1.04	0.54	-2.36	0.022
Largo de la cabeza (LC)	11.71	12.10	1.07	0.65	-1.38	0.173
Dist. hocico-ojo (DH-O)	5.95	6.15	0.38	0.40	-1.77	0.083
Dist. internarinas (DN-N)	2.49	2.53	0.20	0.16	-0.88	0.423
Dist. interocular (DO-O)	3.18	3.34	0.32	0.17	-1.99	0.052
Dist. ojo-narina (DO-N)	3.35	3.45	0.29	0.29	-1.23	0.223
Dist. rostro-narina (DR-N)	3.24	3.54	0.31	0.31	-3.31	0.002
Diámetro del ojo (DO)	4.66	4.88	0.33	0.27	-2.48	0.016
Largo del brazo (LB)	14.36	14.93	0.98	0.71	-2.15	0.036
Largo del 3 dedo (L3Dm)	3.87	4.08	0.34	0.36	-2.09	0.041
Largo del fémur (LF)	15.05	15.62	0.90	0.97	-2.13	0.038
Largo de la tibia (LT)	14.14	14.65	0.76	0.56	-2.53	0.014
Largo de la pata (LP)	21.39	21.85	1.25	0.71	-1.41	0.165
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	6.85	7.12	0.49	0.65	-1.70	0.094
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	4.38	4.37	0.36	0.54	0.08	0.933
DTM-MI	5.30	5.49	0.51	0.44	-1.31	0.195

m = machos (n = 40); h = hembras (n = 17)



***Pleurodema nebulosum* (Burmeister, 1861) (Fig. 25)**

Figura 25: Foto de ejemplar macho adulto de *Pleurodema nebulosum*. Sampacho, Córdoba.

Los 22 individuos analizados morfométricamente provienen de Ischigualasto, provincia de San Juan; Sampacho, provincia de Córdoba y Patquía, provincia de La Rioja y 21 correspondieron a machos. En la Tabla 15 se muestran los valores medios y desvíos estándar de la variable morfométricas relevadas.

Tabla 15: Media y desvío estándar (mm) de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema nebulosum*.

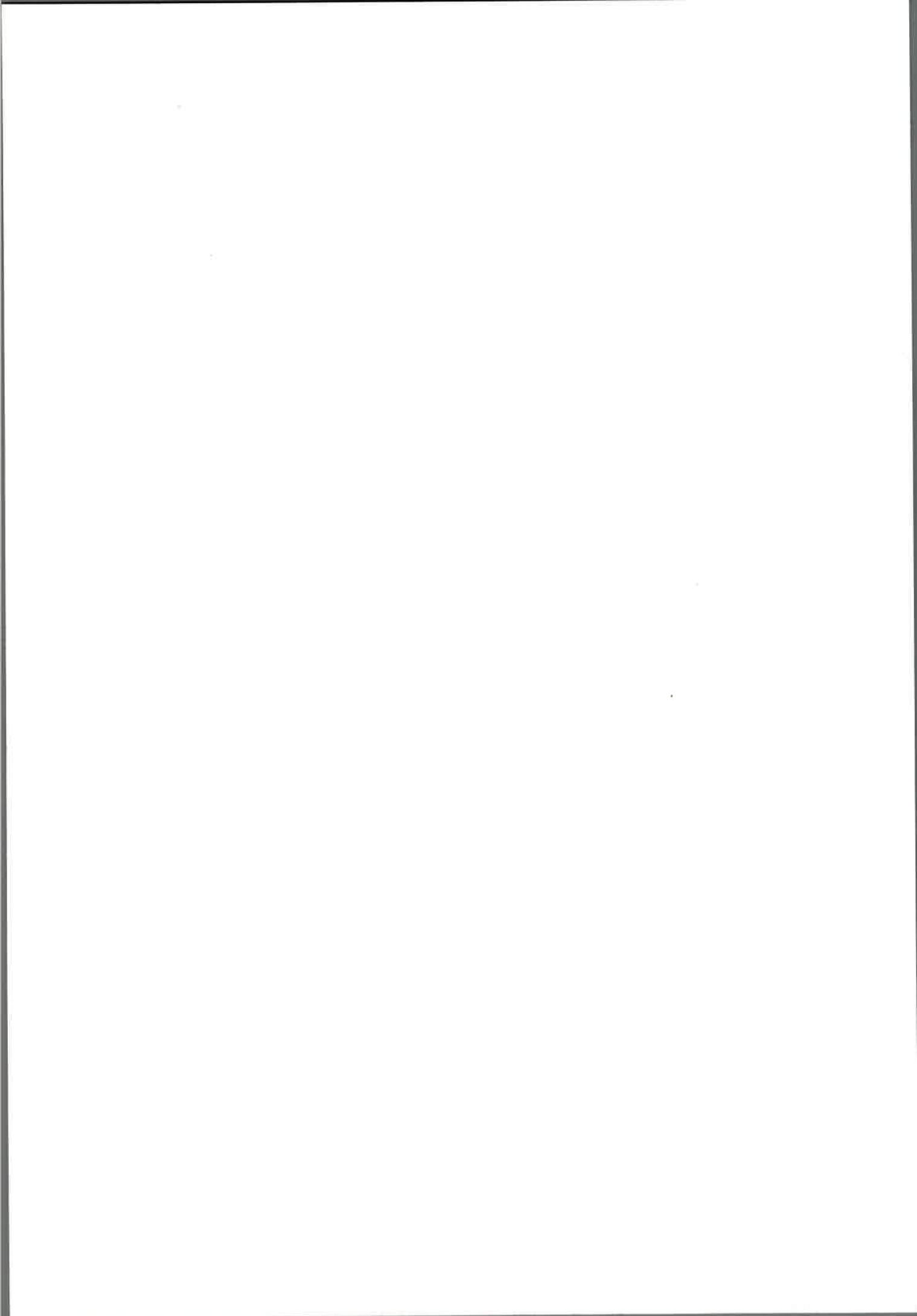
Variables	Promedio		Desvío Estándar
	m	h	m
Largo hocico-cloaca (SVL)	37.49	42.70	2.53
Ancho de la cabeza (AC)	14.96	16.22	1.12
Largo de la cabeza (LC)	13.33	11.94	1.30
Dist. hocico-ojo (DH-O)	5.97	5.74	0.38
Dist. internarinas (DN-N)	2.74	3.14	0.25
Dist. interocular (DO-O)	3.25	2.89	0.30
Dist. ojo-narina (DO-N)	3.25	3.51	0.24
Dist. rostro-narina (DR-N)	3.29	3.70	0.30
Diámetro del ojo (DO)	4.57	5.14	0.34
Largo del brazo (LB)	15.06	15.26	1.26
Largo del 3 dedo (L3Dm)	4.22	4.39	0.42
Largo del fémur (LF)	15.49	17.44	1.36
Largo de la tibia (LT)	14.44	15.41	1.05
Largo de la pata (LP)	22.81	24.08	1.70
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	7.48	7.91	0.63
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	4.22	5.20	0.42
DTM-MI	6.09	6.18	0.78

m = machos (n = 21); h = hembras (n = 1).

El análisis de normalidad realizado a las variables morfométricas de *Pleurodema nebulosum* (tomando solamente a los machos) indicó que en dos variables se debe rechazar la hipótesis de normalidad de los datos (Tabla 16).

Tabla 16: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas para machos (n=21) de *Pleurodema nebulosum* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).

Variable	machos	
	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.871272	0.0084
Ancho de la cabeza (AC)	0.975605	0.8329
Largo de la cabeza (LC)	0.934447	0.1654
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.971612	0.7512
Dist. internarinas (DN-N)	0.972976	0.7799
Dist. interocular (DO-O)	0.969026	0.6955
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.958253	0.4726
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.950956	0.3491
Diámetro del ojo (DO)	0.825307	0.0011
Largo del brazo (LB)	0.941088	0.2249
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.953724	0.3928
Largo del fémur (LF)	0.949432	0.3268
Largo de la tibia (LT)	0.933428	0.1576
Largo de la pata (LP)	0.969879	0.7140
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.983923	0.9588
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.917948	0.0756
DTM-MI	0.984249	0.9620



***Pleurodema kriegi* (Müller, 1926). (Fig. 26)**



Figura 26: Foto de ejemplar macho adulto de *Pleurodema kriegi*. La Posta, Pampa de Achala, Córdoba.

Los 28 individuos analizados de *Pleurodema kriegi* correspondieron a 21 machos y 7 hembras procedentes de la localidad La Posta, Pampa de Achala, provincia de Córdoba. En la Tabla 18 se muestran los parámetros morfométricos de *Pleurodema kriegi* discriminados por sexo. Según los resultados de la prueba de normalidad (Tabla 17) se analizó el dimorfismo sexual en las variables morfométricas con test *t* o Mann Whitney, según corresponda. El análisis comparativo entre sexos indicó que hay dimorfismo sexual en 14 de las 17 variables morfométricas estudiadas (Tabla 18).

Tabla 17: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas tanto para machos (n=21) como para hembras (n=7) de *Pleurodema kriegi* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).

Variable	machos		hembras	
	W	p	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.939683	0.2109	0.990555	0.9912
Ancho de la cabeza (AC)	0.947371	0.2986	0.869373	0.1894
Largo de la cabeza (LC)	0.908372	0.0479	0.919889	0.4862
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.949218	0.3238	0.925378	0.5306
Dist. internarinas (DN-N)	0.962208	0.5503	0.913567	0.4377
Dist. interocular (DO-O)	0.956939	0.4484	0.971195	0.9092
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.930072	0.1346	0.906449	0.3868
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.959657	0.4995	0.943936	0.6911
Diámetro del ojo (DO)	0.940867	0.2227	0.886579	0.2673
Largo del brazo (LB)	0.95179	0.3619	0.909479	0.4079
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.911353	0.0553	0.976964	0.9425
Largo del fémur (LF)	0.934771	0.1679	0.921982	0.5029
Largo de la tibia (LT)	0.92419	0.1019	0.922459	0.5067
Largo de la pata (LP)	0.881375	0.0135	0.70412	0.0040
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.960089	0.5079	0.963726	0.8571
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.945852	0.2790	0.917989	0.4713
DTM-MI	0.93238	0.1501	0.938941	0.6470

Tabla 18: Media y desvío estándar (mm) de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema kriegi* y estadísticos del test *t* entre sexos para cada variable (o *U* de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales). *t* y *U* representan el estadístico, **p** la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes.

Variables	Promedio		Desvío Estándar		Test <i>t</i> o Mann-Whitney	
	m	h	m	h	t o U	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	33.78	38.62	1.91	1.13	-6.30	0.000
Ancho de la cabeza (AC)	13.41	14.81	0.76	0.61	-4.41	0.000
Largo de la cabeza (LC)	11.99	12.25	1.19	1.43	<i>80.0</i>	<i>0.750</i>
Dist. hocico-ojo (DH-O)	5.40	5.93	0.30	0.34	-3.93	0.000
Dist. internarinas (DN-N)	2.10	2.31	0.23	0.24	-2.11	0.045
Dist. interocular (DO-O)	3.07	3.24	0.27	0.27	-1.50	0.145
Dist. ojo-narina (DO-N)	2.87	3.17	0.16	0.12	-4.43	0.000
Dist. rostro-narina (DR-N)	3.09	3.59	0.21	0.26	-5.26	0.000
Diámetro del ojo (DO)	3.67	3.97	0.34	0.46	-1.89	0.070
Largo del brazo (LB)	15.70	17.63	0.95	0.94	-4.64	0.000
Largo del 3 dedo (L3Dm)	5.26	5.74	0.42	0.38	-3.83	0.000
Largo del fémur (LF)	15.09	16.67	0.90	1.08	-3.84	0.001
Largo de la tibia (LT)	15.74	17.41	0.72	0.78	-5.19	0.000
Largo de la pata (LP)	23.43	25.43	0.79	0.83	<i>138.0</i>	<i>0.001</i>
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	9.18	9.95	0.60	0.65	-2.90	0.008
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	5.26	5.74	0.42	0.38	-2.68	0.012
DTM-MI	5.69	6.21	0.46	0.66	-2.30	0.030

m = machos (n = 21); h = hembras (n = 7)

***Pleurodema cordobae* Valetti, Salas y Martino, 2009. (Fig. 27)**



Figura 27: Foto de ejemplar macho adulto de *Pleurodema cordobae*. Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, Córdoba.

Los 39 ejemplares analizados de *Pleurodema cordobae* correspondieron a 37 machos y 2 hembras procedentes de la localidad de Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, provincia de Córdoba. En la Tabla 19 se presentan los valores medios y desvíos estándar discriminados por sexos para cada variable morfométrica.

La prueba de normalidad realizada a los datos (tomando solamente a los machos) indicó que en dos variables se debió rechazar la hipótesis de normalidad, aceptando la normalidad en las restantes 15 variables (Tabla 20).

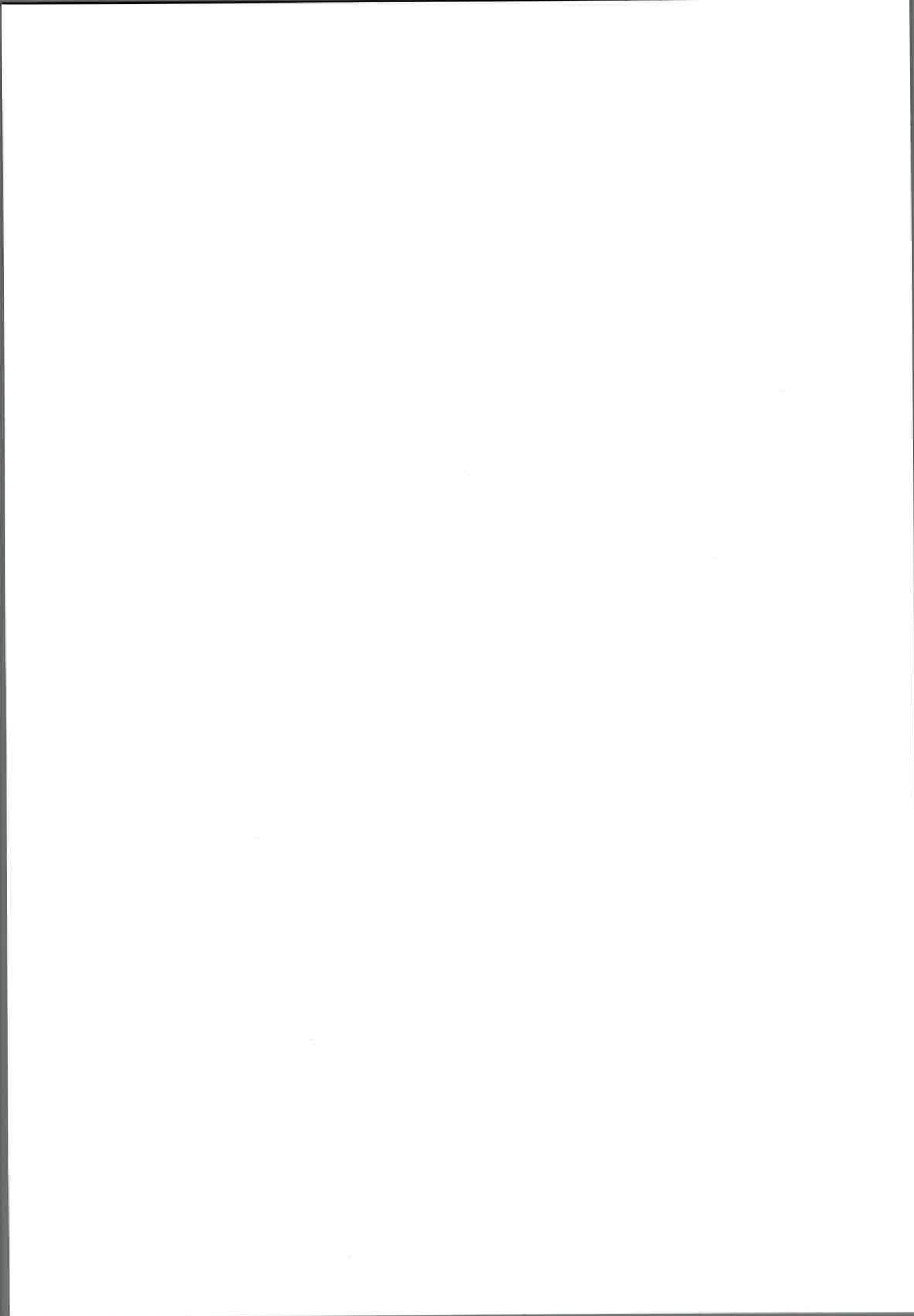


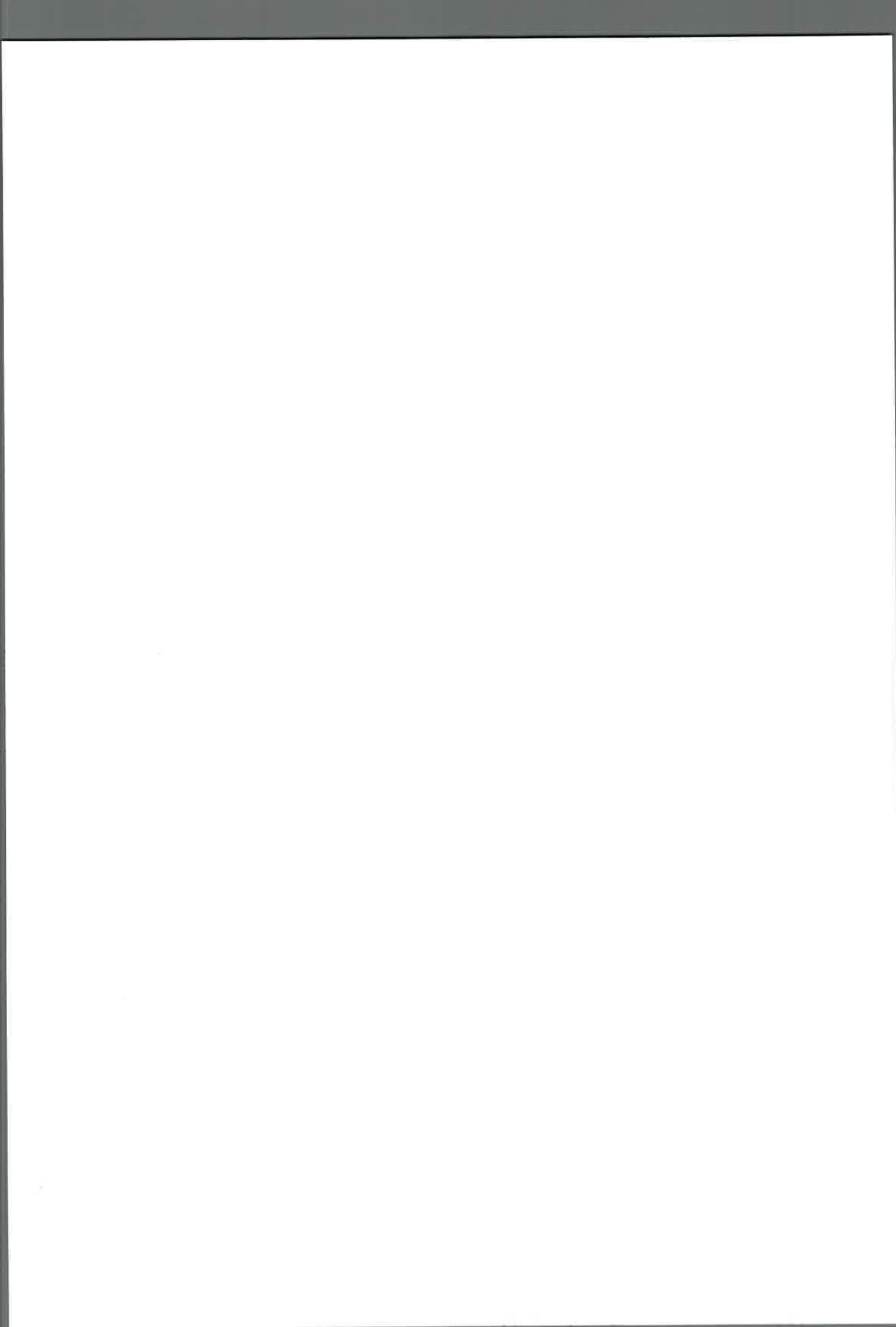
Tabla 19: Media y desvío estándar (mm) de las variables morfométricas de la especie *Pleurodema cordobae*.

Variables	Promedio		Desvío Estándar
	m	h	m
Largo hocico-cloaca (SVL)	35.78	41.20	1.71
Ancho de la cabeza (AC)	13.52	15.28	0.93
Largo de la cabeza (LC)	13.12	15.30	1.41
Dist. hocico-ojo (DH-O)	5.65	6.59	0.33
Dist. internarinas (DN-N)	2.23	2.59	0.21
Dist. interocular (DO-O)	3.03	3.48	0.37
Dist. ojo-narina (DO-N)	2.87	3.47	0.26
Dist. rostro-narina (DR-N)	3.39	4.13	0.35
Diámetro del ojo (DO)	3.80	4.20	0.31
Largo del brazo (LB)	16.44	18.82	0.93
Largo del 3 dedo (L3Dm)	5.37	6.25	0.41
Largo del fémur (LF)	15.31	17.32	0.96
Largo de la tibia (LT)	16.22	19.02	0.98
Largo de la pata (LP)	24.70	28.61	1.27
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	9.98	12.08	0.62
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	5.53	6.17	0.37
DTM-MI	5.89	6.66	0.70

m = machos (n = 37); h = hembras (n = 2)

Tabla 20: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas para machos (n=37) de *Pleurodema cordobae* y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).

Variable	machos	
	W	p
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.972653	0.5801
Ancho de la cabeza (AC)	0.972861	0.5864
Largo de la cabeza (LC)	0.93689	0.0479
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.974461	0.6356
Dist. internarinas (DN-N)	0.953255	0.1652
Dist. interocular (DO-O)	0.955349	0.1922
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.975703	0.6742
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.970464	0.5151
Diámetro del ojo (DO)	0.968193	0.4517
Largo del brazo (LB)	0.953973	0.1740
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.990756	0.9909
Largo del fémur (LF)	0.971075	0.5329
Largo de la tibia (LT)	0.921346	0.0143
Largo de la pata (LP)	0.976926	0.7120
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.978472	0.7590
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.944705	0.0873
DTM-MI	0.934801	0.2225



Comparaciones interespecíficas

De las cinco especies analizadas, *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. kriegi* mostraron dimorfismo sexual en numerosas variables (Tablas 12, 14 y 18), en tanto que en *P. cordobae* y *P. nebulosum* no se obtuvo un número considerable de hembras que permitiera evaluar la posible existencia de diferenciación sexual en estas variables morfométricas. Por lo tanto, el análisis morfométrico comparativo entre las especie se llevó a cabo con 212 individuos machos de las cinco especies en estudio.

El Análisis de Componentes Principales con rotación Varimax arrojó tres Factores con eigenvalores >1. Los primeros dos Componentes explican el 66% de la variabilidad de los datos (Tabla 21).

Las variables de mayor importancia en el Componente 1 son aquellas relacionadas a los huesos largos (Brazo, Tibia, Pié, Tercer dedo de la mano, Tercer y Cuarto dedo del pié). Por otro lado, las variables de mayor peso en el Componente 2 fueron aquellas más relacionadas con la forma (SVL, Ancho de la cabeza, Distancia hocico-ojo, Distancia ojo-narina, Diámetro del ojo) (Tabla 21, Fig. 28).

Tabla 21: Eigenvectores, eigenvalores y porcentaje de varianza explicada para los tres Factores con eigenvalores >1 resultantes del análisis de componentes principales, luego de la rotación varimax, para los datos de morfometría de las cinco especies de *Pleurodema* (*P. tucumanum*, *P. guayapae*, *P. nebulosum*, *P. kriegi* y *P. cordobae*). Se destacan las variables de mayor importancia en cada Factor.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.1508	0.8999	-0.0224
Ancho de la cabeza (AC)	0.0844	0.9048	-0.0262
Largo de la cabeza (LC)	0.2021	0.0421	0.8229
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.2203	0.8346	0.1541
Dist. internarinas (DN-N)	-0.3829	0.4450	0.5048
Dist. interocular (DO-O)	-0.0047	0.3507	-0.3677
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.0521	0.8471	-0.1525
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.4231	0.6016	0.3266
Diámetro del ojo (DO)	-0.3978	0.7208	0.1332
Largo del brazo (LB)	0.8254	0.3462	-0.0548
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.8996	-0.1209	0.0027
Largo del fémur (LF)	0.5416	0.6679	-0.0046
Largo del pié (LT)	0.8741	0.2151	0.1049
Largo de la pata (LP)	0.8714	0.3389	0.1026
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.9338	-0.1543	0.0454
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.8872	-0.0037	0.0185
DTM-MI	0.5789	0.4899	0.1043
<i>Eigenvalor</i>	<i>7.07191</i>	<i>4.14737</i>	<i>1.21856</i>
<i>Porcentaje de varianza</i>	<i>41.599</i>	<i>24.396</i>	<i>7.168</i>

El diagrama de dispersión de los dos primeros Factores muestra la formación de dos grupos (Fig. 28a). El primer grupo, al que pertenecen las especies de *Pleurodema* con glándulas lumbares (*P. cordobae* y *P. kriegi*), se relaciona con valores altos del Factor 1, en tanto que el segundo grupo conformado por las especies de *Pleurodema* carentes de glándulas (*P. tucumanum*, *P. nebulosum* y *P. guayapae*) se asocia con los valores bajos del primer Factor. En este diagrama no se puede observar separación morfométrica entre las especies *P. kriegi* y *P. cordobae*. En cuanto a las especies sin glándulas lumbares, *P. tucumanum* parece mostrar una segregación parcial respecto a *P. nebulosum* y *P. guayapae*, mostrando valores menores del Factor 1 y 2, en tanto que *P. nebulosum* y *P. guayapae* no parecen mostrar segregación respecto a estos Factores.

Los resultados obtenidos indicarían que la separación de *P. kriegi* y *P. cordobae* de las restantes especies se deberían a los mayores valores de las variables relacionadas con los huesos largos, en tanto que la separación parcial de *P. tucumanum* respecto de *P. nebulosum* y *P. guayapae* podría deberse a un menor tamaño corporal (SVL y ancho de la cabeza).

El Análisis Discriminante maximizó las diferencias encontradas en el análisis de Componente Principal, donde la Función Discriminante 1 indica una clara separación de las especies con glándulas lumbares respecto de aquellas carentes de las mismas (Fig. 29). Si bien cuatro Funciones Discriminantes resultaron significativas (Tabla 22), las primeras dos mostraron un lambda de Wilks muy bajo indicando un alto poder discriminatorio de las variables. Así mismo, la correlación canónica de 0.965 y 0.8374 para la primer y segunda Función Discriminante, respectivamente, indican un alto poder discriminante de las funciones generadas.

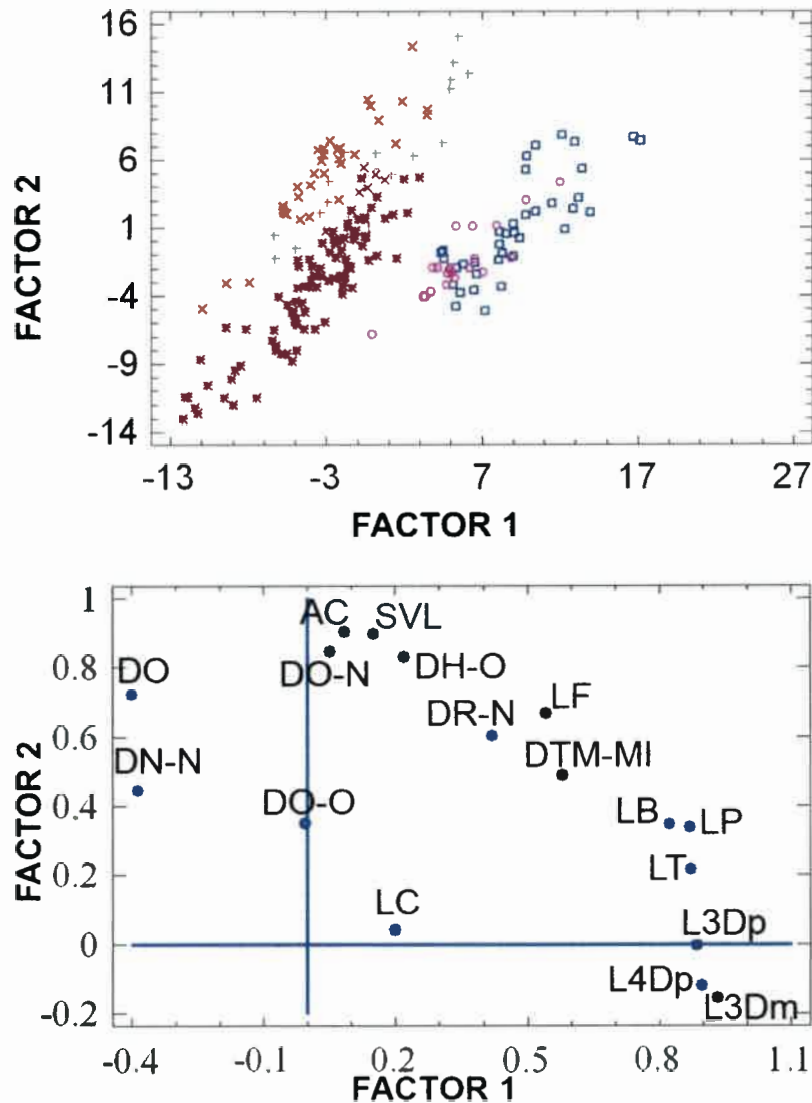


Figura 28: a) Diagrama de dispersión de los valores de los dos primeros Componentes Principales para *P. tucumanum* (*), *P. guayapae* (x), *P. nebulosum* (+), *P. kriegi* (o) y *P. cordobae* (□). Los eigenvalores, eigenvectores y el porcentaje de varianza explicada por cada Componente se muestran en la Tabla 21. b) Diagrama de dispersión de las variables morfométricas sobre los primeros dos Componentes.

La reclasificación de los individuos en las especies por medio de las Funciones Discriminantes arroja un valor de 93.87% de los casos bien asignados (Tabla 23), mostrando un menor valor de clasificación positiva en *P. cordobae*, donde 7 de los 37 individuos fueron reclasificados erróneamente como *P. kriegi*. Sin embargo, se puede apreciar la existencia de una marcada diferenciación morfométrica entre las especies en estudio.

Tabla 22: Funciones Discriminantes basadas en variables morfométricas para distinguir las cinco especies de *Pleurodema*

Función Discriminante	Eigenvalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica	Lambda de Wilks	χ^2	g.l.	Significancia
1	13.6878	80.72	0.965	0.0098	925.489	68	$p < 0.0001$
2	2.3476	13.84	0.837	0.1436	388.086	48	$p < 0.0001$
3	0.6967	4.11	0.641	0.4809	146.439	30	$p < 0.0001$
4	0.2257	1.33	0.429	0.8159	40.699	14	$p = 0.0002$

Tabla 23: Tabla de clasificación del Análisis Discriminante basado en variables morfométricas para distinguir las cinco especies de *Pleurodema*. El porcentaje de clasificación correcta total es 93.87.

Especie	n	Especie predicha				
		<i>P. tucumanum</i>	<i>P. guayapae</i>	<i>P. nebulosum</i>	<i>P. kriegi</i>	<i>P. cordobae</i>
<i>P. tucumanum</i>	93	92 (98.92%)	0	1 (1.08%)	0	0
<i>P. guayapae</i>	40	0	39 (97.50%)	1 (2.50%)	0	0
<i>P. nebulosum</i>	21	2 (9.52%)	1 (4.76%)	18 (85.71%)	0	0
<i>P. kriegi</i>	21	0	0	0	20 (95.24%)	1 (4.76%)
<i>P. cordobae</i>	37	0	0	0	7 (18.92%)	30 (81%)

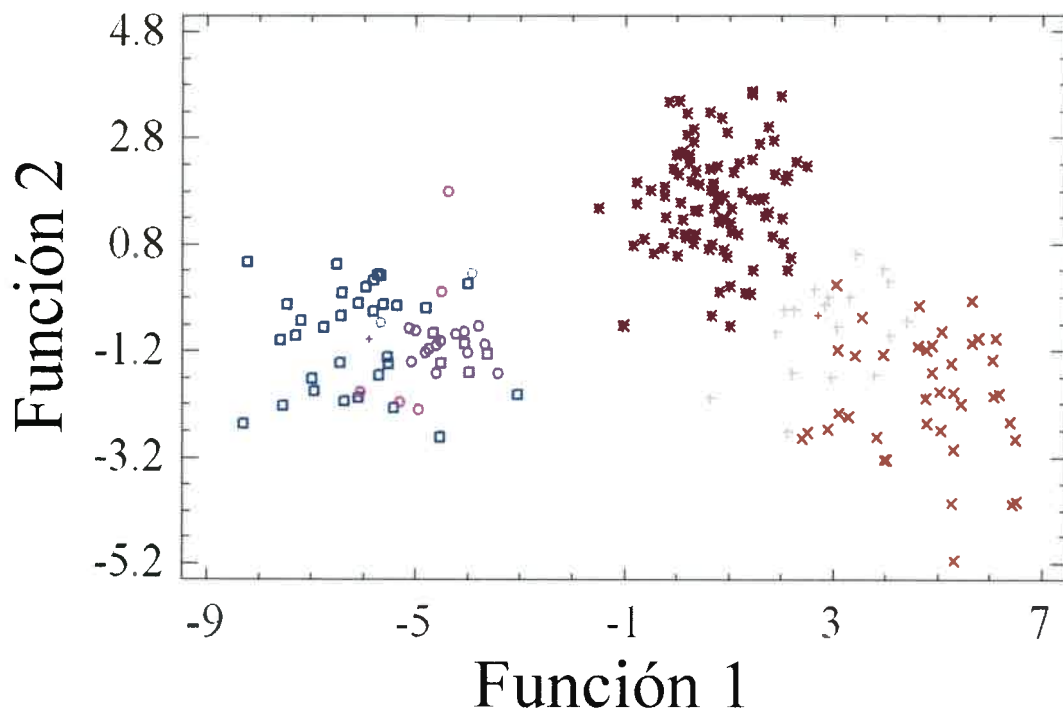


Figura 29: Diagrama de dispersión de los valores de las dos Funciones Discriminantes basadas en variables morfométricas para *P. tucumanum* (*), *P. guayapae* (x), *P. nebulosum* (.), *P. kriegi* (o) y *P. cordobae* (a).



Como consecuencia de los resultados obtenidos en el Análisis Discriminante se procedió a realizar análisis univariados para todas las variables morfométricas comparando el grupo de especies que poseen glándulas respecto al grupo de especies que no poseen. Se obtuvieron diferencias significativas en 11 variables morfométricas, incluidas todas las relacionadas a los de huesos largos (Tabla 24), corroborando lo obtenido en el análisis discriminante.

Tabla 24: Resultados del Test de normalidad de las variables morfométricas para machos tanto del grupo de *Pleurodema* con glándulas ($n = 58$) como del grupo sin glándulas ($n = 154$) y su significancia.

W representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad.

Estadísticos del test *t* entre grupos para cada variable (o *U* de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales). *t* y **U** representan el estadístico, **p** la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes. ($\alpha = 0.05$).

Variables	Test de Shapiro-Wilks				Test <i>t</i> o <i>Mann-Whitney</i>	
	Sin glándulas		Con glándulas		<i>t</i> o <i>U</i>	p
	W	p	W	p		
Largo hocico-cloaca (SVL)	0.971831	0.0781	0.977317	0.5777	0.68051	0.4969
Ancho de la cabeza (AC)	0.975829	0.1915	0.968233	0.2684	1.65815	0.0988
Largo de la cabeza (LC)	0.963183	0.0066	0.938287	0.0083	4709.0	0.5425
Dist. hocico-ojo (DH-O)	0.970655	0.0582	0.967813	0.2577	-0.42864	0.6686
Dist. internarinas (DN-N)	0.982207	0.5410	0.97159	0.3663	9.73753	0.0000
Dist. interocular (DO-O)	0.964577	0.0103	0.966515	0.2266	4531.0	0.8713
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.982155	0.5375	0.976937	0.5625	1.3292	0.1852
Dist. rostro-narina (DR-N)	0.9569	0.0008	0.952893	0.0501	5249.5	0.0492
Diámetro del ojo (DO)	0.980614	0.4382	0.960747	0.1233	10.2369	0.0000
Largo del brazo (LB)	0.978652	0.3231	0.969227	0.2951	-13.1426	0.0000
Largo del 3 dedo (L3Dm)	0.980659	0.4411	0.969664	0.3075	-19.644	0.0000
Largo del fémur (LF)	0.98651	0.8068	0.973419	0.4285	-4.98322	0.0000
Largo de la tibia (LT)	0.971049	0.0643	0.970343	0.3274	-14.3564	0.0000
Largo de la pata (LP)	0.977783	0.2779	0.94623	0.0223	8454.5	0.0000
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	0.986753	0.8193	0.979113	0.6506	-24.8908	0.0000
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	0.970352	0.0538	0.978963	0.6445	-17.5479	0.0000
DTM-MI	0.98153	0.4967	0.929545	0.0027	6630.5	0.0000



Comparaciones entre especies sin glándulas: *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum*

Las comparaciones univariadas de todas variables morfométricas demuestran, al igual que en el Análisis de Componente Principales, que *Pleurodema tucumanum* es la especie que más se diferencia de las tres. Doce variables de 17 y 13 de 17 (10 en común) de *Pleurodema tucumanum* resultaron estadísticamente diferentes de *P. guayapae* y *P. nebulosum*, respectivamente (Tabla 25). El largo hocico cloaca y el ancho de la cabeza son dos de las variables que resultaron estadísticamente diferentes entre *P. tucumanum* y las demás especies carentes de glándulas y en ambos casos *P. tucumanum* presentó los menores valores respecto a *P. guayapae* y *P. nebulosum*. Por otro lado, estas últimas dos especies mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí en 8 variables morfométricas (Tabla 25), y una de esas variables fue el largo hocico cloaca resultando mayor en *Pleurodema guayapae*.

Tabla 25: Estadísticos del test *t* (o *U* de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales) entre las especies de *Pleurodema* sin glándulas para cada variable morfométrica. *t* y *U* representan el estadístico, *p* la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Variables	<i>P. tucumanum</i> vs. <i>P. nebulosum</i>		<i>P. tucumanum</i> vs. <i>P. guayapae</i>		<i>P. guayapae</i> vs. <i>P. nebulosum</i>	
	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>
Largo hocico-cloaca (SVL)	1785.0	0.0000	-14.017	0.0000	621.0	0.0023
Ancho de la cabeza (AC)	1822.0	0.0000	3532.5	0.0000	-0.7546	0.4535
Largo de la cabeza (LC)	1228.5	0.0660	938.5	0.0000	5.2140	0.0000
Dist. hocico-ojo (DH-O)	1734.0	0.0000	3244.0	0.0000	0.1568	0.8760
Dist. internarinas (DN-N)	-3.6784	0.0004	0.6539	0.5142	4.2970	0.0001
Dist. interocular (DO-O)	1487.5	0.0002	2634	0.0001	0.8232	0.4137
Dist. ojo-narina (DO-N)	-8.5012	0.0000	-12.2553	0.0000	-1.3231	0.1909
Dist. rostro-narina (DR-N)	1299.0	0.0185	2364.0	0.0134	0.6562	0.5143
Diámetro del ojo (DO)	1622.0	0.0000	-8.4885	0.0000	519.5	0.1328
Largo del brazo (LB)	-6.5524	0.0000	-4.8806	0.0000	2.4023	0.0195
Largo del 3 dedo (L3Dm)	1064.0	0.5246	1065.0	0.0000	3.4887	0.0009
Largo del fémur (LF)	-6.5515	0.0000	-6.95	0.0000	1.5231	0.1331
Largo de la tibia (LT)	1130.5	0.2618	1833.5	0.8985	1.3135	0.1941
Largo del pie (LP)	1588.0	0.0000	2169.0	0.1301	3.7082	0.0005
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	-0.0556	0.9557	6.6781	0.0000	4.2671	0.0001
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	1.6098	0.1103	-0.1616	0.8719	-1.6370	0.1069
DTM-MI	-7,1819	0.0000	-2.7954	0.0060	4.7682	0.0000



Comparaciones entre especies con glándulas: *P. kriegi* y *P. cordobae*

Pleurodema kriegi y *Pleurodema cordobae* se diferencian notoriamente de las demás especies (Tabla 24), y además se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas en 11 variables morfométricas (Tabla 26). En todos los casos, los valores medios de las variables morfométricas de *Pleurodema cordobae* resultaron mayores a *P. kriegi*, sin embargo existe un alto grado de solapamiento de los datos.

Tabla 26: Estadísticos del test *t* (o *U* de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales) entre las especies de *Pleurodema* con glándulas para cada variable morfométrica. *t* y *U* representan el estadístico, *p* la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Variables	<i>P. kriegi</i> vs. <i>P. cordobae</i>	
	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>
Largo hocico-cloaca (SVL)	4.1071	0.0001
Ancho de la cabeza (AC)	-0.5319	0.5969
Largo de la cabeza (LC)	<i>565.0</i>	0.0044
Dist. hocico-ojo (DH-O)	-2.8328	0.0064
Dist. internarinas (DN-N)	-2.2676	0.0272
Dist. interocular (DO-O)	0.3925	0.6961
Dist. ojo-narina (DO-N)	0.0870	0.9309
Dist. rostro-narina (DR-N)	-3.5483	0.0008
Diámetro del ojo (DO)	-1.5203	0.1341
Largo del brazo (LB)	-2.8506	0.0061
Largo del 3 dedo (L3Dm)	-3.4567	0.0011
Largo del fémur (LF)	-0.8419	0.4034
Largo de la tibia (LT)	<i>549.0</i>	0.0096
Largo de la pata (LP)	<i>625.5</i>	0.0001
Largo del 4 dedo del pie (L4Dp)	-4.7604	0.0000
Largo del 3 dedo del pie (L3Dp)	-2.5897	0.0122
DTM-MI	-1.1329	0.2621

Discusión

Los resultados del análisis morfométrico muestran que las cinco especies de *Pleurodema* poseen valores de largo hocico-cloaca promedios en un rango de 32 a 43 mm. *Pleurodema tucumanum* resultó ser la especie más pequeña y *P. guayapae* y *P. nebulosum* las mayores. Tanto *P. kriegi* como *P. cordobae* poseen valores intermedios a las especies mencionadas. Las especies de la familia Leiuperidae se caracterizan por poseer un pequeño tamaño y dentro del género *Pleurodema* se reportaron tamaños corporales de las especies comprendidos entre 29 y 49 mm. (Barrio, 1964; Müller, 1926; Parker, 1927; Gallardo, 1968; Laurent, 1969; Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Braun, 1973; Laurent, 1975; Duellman & Veloso, 1977; Barrio, 1977; Cei, 1980; Cei, 1990; McLister *et al.*, 1991; Hödl, 1992; Baldo & Gutierrez, 1997; Villavicencio *et al.*, 2007; Alves dos Santos *et al.*, 2003; Lourenço *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2006; Kolenc *et al.*, 2009; Valetti *et al.*, 2009).

En las especies que se pudo realizar el análisis comparativo entre sexos, se observó un dimorfismo sexual marcado, principalmente en *P. tucumanum* donde las 17 variables analizadas resultaron significativamente diferentes, con valores mayores en las hembras. Estos resultados concuerdan con Duellman & Veloso (1977) que manifiestan la presencia de un pequeño dimorfismo sexual en cuanto al tamaño en las especies *P. guayapae*, *P. kriegi* y *P. nebulosum*, pero indican un dimorfismo sexual extremo en *P. tucumanum*, correspondiendo a un mayor tamaño corporal de las hembras en todos los casos. Este dimorfismo sexual en el tamaño corporal con hembras mayores a los machos es común en los anuros (Shine, 1979; Zug *et al.*, 2001). La fecundidad de las hembras se incrementa a mayores tamaños corporales a una tasa mayor que los sucesos reproductivos de los machos (Crump, 1974), por lo tanto la selección favorecerá a hembras de mayor porte que los machos (Shine, 1979).

Por el contrario, en algunas especies de anuros, los machos poseen un mayor tamaño que las hembras y esto se ha observado en las especies donde los machos reproductivos entran en combates físicos (“wrestling”) entre si (Shine, 1979; Duellman & Trueb, 1986). Estudios de campo y laboratorio indicarían que el mayor tamaño en los machos le confiere una ventaja al momento de los combates con individuos de su mismo sexo (Davies & Halliday, 1977; Wells, 1978). Las observaciones a campo

durante los muestreos realizados en las diferentes especies nos permiten manifestar que podría haber una competencia entre los machos en la selección de los sitios de canto. Sin embargo, combates físicos entre individuos no fueron observados regularmente. En una única ocasión, se observó una intensa actividad de combates físicos entre machos de *P. tucumanum* en el momento en que ellos emitían los cantos de advertencia en una charca temporaria en cercanías de la localidad de Patquía, La Rioja, en sintopía con *P. nebulosum*. En tal oportunidad, la gran agregación reproductiva, generada en esta laguna luego de una lluvia intensa, produjo una densidad de machos muy alta respecto a los sitios de canto en este cuerpo de agua y quizás esta situación no sea habitual en esta especie.

El análisis morfométrico multivariado de las cinco especies demuestra la presencia de dos grupos bien separados, conformados uno por las especies poseedoras de glándulas lumbares y el otro por aquellas carentes de las mismas. *Pleurodema cordobae* y *P. kriegi* tienen una morfología muy diferente a las restantes especies analizadas. Sus cuerpos son más estilizados (Figs. 26 y 27), en cambio en *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum* los cuerpos son más robustos (Figs. 23, 24 y 25). Tal como indican los resultados, las medidas morfométricas que diferencian a las especies poseedoras de glándulas del resto son aquellas asociadas a los huesos largos. Zug (1978) analizó el rendimiento del salto de las especies según el ambiente en que se encuentran. Para ello separó las especies en arbóreas, terrestres y semiacuáticas y determinó que las especies arbóreas poseen una habilidad para el salto (jumping ability) superior a las especies terrestres, quedando las especies semiacuáticas en el medio. Las especies de *Pleurodema* carentes de glándulas estudiadas aquí habitan un ambiente terrestre árido y solamente se encuentran cerca o dentro de los cuerpos de agua temporarios en la estación reproductiva. Las especies con estas condiciones fueron consideradas por Zug (1978) como terrestres y morfológicamente caracterizadas por miembros cortos que le permiten saltos pequeños y alta movilidad para caminar. Por otro lado, las especies semiacuáticas viven en ambientes más húmedos y suelen ser excelentes nadadores, poseen miembros relativamente más largos y producen saltos mayores. En este último grupo podrían entrar *Pleurodema kriegi* y *Pleurodema cordobae*, que habitan en los pastizales de altura de la Sierra de Córdoba donde las lagunas que se forman son abundantes desde el comienzo de la época de lluvia e incluso

durante el invierno. Por lo tanto, es muy probable que la historia evolutiva de estos dos grupos de especies habitando en lugares con diferentes condiciones haya hecho posible una diferenciación morfológica que se evidenció en el análisis morfométrico realizado.

Dentro del grupo de especies carentes de glándulas, *Pleurodema guayapae* y *P. nebulosum* resultaron ser las especies morfométricamente más similares, diferenciándose en mayor grado respecto de *P. tucumanum*. Esta misma asociación fue establecida por Barrio (1964) al encontrar un mayor grado de divergencia morfológica de *P. tucumanum* respecto a *P. nebulosum* y *P. guayapae* que entre éstas dos últimas. A su vez Barrio (1964) destaca por primera vez la presencia de híbridos entre estas dos especies, basado en análisis de la exomorfología, bioacústica y electroforesis de seroproteínas. La presencia de los híbridos estaría indicando una relación filogenética muy cercana entre estas dos especies.

En el otro grupo, *Pleurodema kriegi* y *P. cordobae* mostraron diferencias significativas en 11 variables morfométricas pero con un importante solapamiento de los datos y no se encontraron caracteres morfológicos diagnósticos. Por lo tanto, basándose solamente en la morfometría, no ha sido posible una distinción inequívoca de estas dos especies (Valetti *et al.*, 2009). Resultados similares fueron obtenidos por McLister *et al.*, (1991) al analizar comparativamente la morfología de *P. kriegi* y *P. bibrioni*, llegando a proponer una diferenciación a nivel subespecífico. La presencia de especies crípticas se relaciona frecuentemente con un estancamiento en la diferenciación morfológica durante el proceso de especiación. Muchas veces la falta de diferenciación morfológica entre especies crípticas es interpretada como el producto de una reciente especiación, por lo tanto, el corto tiempo evolutivo podría explicar la escasa diferenciación morfológica observada entre ellas. Por otro lado están aquellos que interpretan la falta de diferenciación morfológica entre especies crípticas debido a que entre estas especies se produce una diferenciación mediante señales de cortejo no visuales (ej. sonidos, feromonas, señales eléctricas, vibraciones) y estarían bajo una selección que promueve el estasis morfológico (Schröngge *et al.*, 2002; Bickford *et al.*, 2007;). Si bien es aceptado que la poliploidización es un evento de especiación instantáneo (Orr, 1990), no hay estudios realizados hasta el momento para conocer el tiempo de evolución independiente entre *P. kriegi* y *P. cordobae* como para interpretar la similitud morfológica entre ellas. Sin embargo, podría ser posible que la similitud

morfológica se deba a un corto periodo de tiempo en el proceso de especiación por poliploidía que conlleva a un aislamiento reproductivo que no refleja una diferenciación morfológica muy marcada.

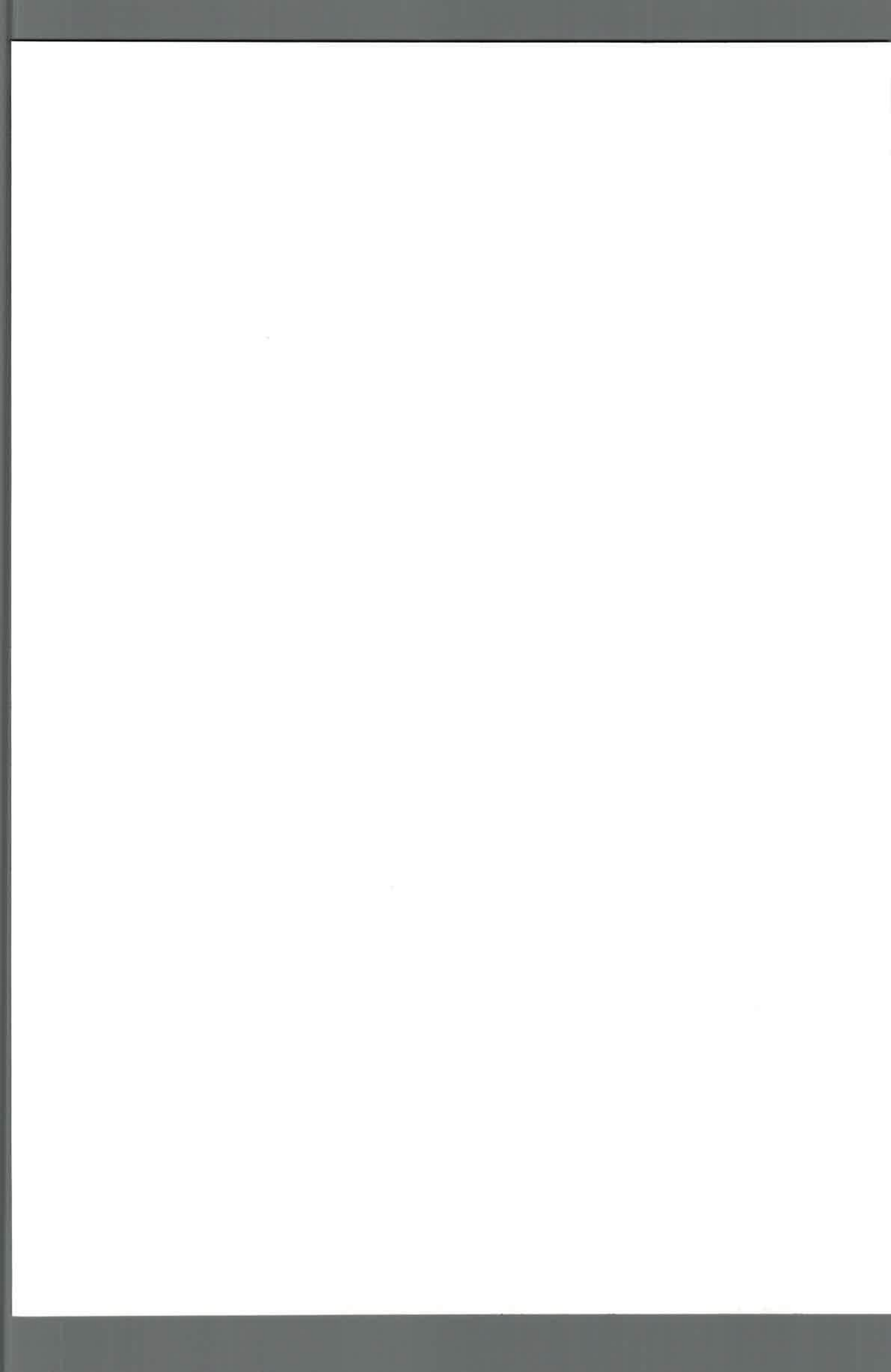


CAPÍTULO IV: ASPECTOS BIOACÚSTICOS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Pleurodema* DEL ÁREA CENTRAL DE ARGENTINA

Introducción

La comunicación entre los organismos animales se establece mediante el empleo de señales. Estas señales son cambios en el ambiente causados por un individuo (el emisor) que contienen información para otro individuo (receptor). Las señales más comunes son las químicas, gestuales y sonoras (Endler, 1993). La comunicación sonora está ampliamente difundida entre los vertebrados y estas señales acústicas en los anuros proveen información sobre el sexo, tamaño, condición física y estado motivacional del emisor (Gerhardt & Bee, 2007; Ursprung *et al.*, 2008). Por lo tanto, la vocalización es el tipo de señal más importante en los anfibios anuros (Walkowiak, 2007; Gerhardt & Bee, 2007). En la mayoría de las especies de anuros existe un amplio repertorio de cantos (Littlejohn, 1977), los cuales varían en relación al contexto social en que se encuentran. Sobre la base de su significado biológico, las emisiones acústicas de los anuros han sido clasificados como cantos de advertencia (“advertisement call”), canto de liberación (“release call”) y canto de angustia (“distress call”) (Bogert 1960, modificado por Littlejohn, 1977 y Wells, 1977). Estas emisiones sonoras juegan un rol importante en las historias de vida de los anuros, constituyendo un importante mecanismo de comunicación tanto intra como interespecífico (Duellman & Trueb, 1986). En particular, el canto de advertencia es producido por los machos con el fin de atraer hembras coespecíficas y delimitar el territorio hacia otros machos potencialmente competidores. Por lo tanto, asumiendo que existen mecanismos de aislamientos pre y postreproductivos (Mayr, 1963), este canto actúa como un importante mecanismo de aislamiento prereproductivo entre especies simpátricas y por lo tanto, al ser un atributo específico de cada especie (Gerhardt & Davis, 1988), es un elemento de alto valor taxonómico (Blair, 1958; Bogert, 1960; Barrio, 1964; Bogart & Wasserman, 1972; Schiotz, 1973; Littlejohn, 1977; Duellman & Pyles, 1983; Platz & Forester, 1988; Basso, 1990; Martino & Sinsch, 2002; Angulo & Reichle, 2008).

Dentro de los anfibios anuros existen diferentes mecanismos en la producción de sonido. Los arqueobatracios carecen de sacos vocales y algunas especies emplean mecanismos inspiratorios en la producción del sonido, en tanto que los neobatracios



emplean un mecanismo espiratorio. Las especies de éste último grupo han desarrollado sacos vocales que son divertículos de la cavidad bucal, únicos o pareados, que pueden servir como resonadores o radiadores acústicos (Watkins *et al.*, 1970; Walkowiak, 2007). En este caso, el flujo de aire es producido por la contracción de los músculos del tronco y el aire pasa de los pulmones hacia la cavidad bucal, atravesando la laringe que es el lugar donde se produce el sonido (Duellman & Trueb, 1986). A continuación el aire regresa hacia los pulmones por contracción de los músculos de los sacos vocales y el piso de la cavidad bucal. Las características del sonido producido dependen del modo en que se realizan las contracciones de los músculos del tronco. Una contracción continua genera un flujo de aire ininterrumpido produciendo oscilaciones pasivas de las cuerdas vocales y los cartílagos aritenoides, en tanto que contracciones repetitivas y continuas de los músculos del tronco producen vocalizaciones pulsadas (Martin 1971, 1972).

La gran radiación adaptativa ocurrida en el grupo de los anuros ha dado origen a una diversidad acústica muy alta entre los diferentes grupos taxonómicos, originando variados cantos de advertencias caracterizados por diferentes patrones. El modo más simple de definir los cantos de advertencia es basado en los patrones temporales (Littlejohn, 2001). De esta manera, algunas especies poseen cantos con una nota simple o una serie de notas repetidas. Otros cantos están constituidos por una sola nota pulsada o por varias notas pulsadas, denominándose también a estas emisiones, cantos simples y cantos compuestos, respectivamente. En un grado de mayor complejidad hay especies que poseen cantos difásicos, o sea, con diferentes notas en sus cantos (Wells, 1988; Littlejohn, 2001).

Además de la variación intrínseca que poseen los cantos, existen agentes externos que pueden afectar las propiedades acústicas de dichos cantos. Debido a que los anfibios anuros son ectotermos, la temperatura ambiental afecta los diferentes procesos etológicos y fisiológicos de estos organismos (Duellman & Trueb, 1986) y por lo tanto las propiedades de sus cantos podrían variar con la temperatura. La correlación de varios parámetros temporales del canto de advertencia y la temperatura ya ha sido demostrada en numerosas especies de anuros (e.j. Blair, 1958; Zweifel, 1959; Gerhardt, 1978; Gayou, 1984; Schneider & Sinsch, 1992; Schneider *et al.*, 1993; Márquez & Bosch, 1995; Navas, 1996; Schneider & Sinsch, 1999; Esteban *et al.*, 2002; Martino &



Sinsch, 2002, Heyer & Reid, 2003). Barrio (1964), Duellman & Veloso (1977), McLister *et al.*, (1991) y Kolenc *et al.*, (2009) describieron y compararon cantos de diferentes especies del género *Pleurodema*, pero el número de cantos considerados fue bajo y/o el efecto de la temperatura sobre sus componentes no ha sido evaluado.

Considerando la importancia de conocer y analizar comparativamente el canto de advertencia de las especies de anuros del género *Pleurodema* y establecer la variación de sus componentes respecto a factores ambientales, en esta sección se plantean los siguientes objetivos: 1) Caracterizar bioacústicamente cada especie analizada; 2) Determinar y cuantificar el efecto de la temperatura sobre las variables acústicas del canto de advertencia de las especies; 3) Analizar el grado de diferenciación bioacústica entre las especies estudiadas.

Materiales y Métodos:

El registro de la serie de cantos de advertencia se realizó *in situ* mediante un grabador Sony™ TCD-100 con micrófono estéreo ECM-MS907 Sony™ y cintas de registro TDK™ DA-RXG 60 y con un grabador Aiwa TP-VS485 y cintas de registro TDK™ MC 60. Inmediatamente después del registro acústico se relevaron las temperaturas del substrato y del agua en los microhábitats utilizados por los individuos para emitir sus cantos mediante un termómetro de precisión de 0.1 °C. Se analizaron 774 cantos correspondientes a 245 individuos de cinco especies de *Pleurodema*: *P. tucumanum*, *P. guayapae*, *P. nebulosum*, *P. kriegi* y *P. cordobae* y (Tabla 27). Los cantos de advertencia fueron relevados en 17 localidades con un amplio rango de temperatura.

Tabla 27: Datos de cantidad de cantos, temperatura de registro y ubicación geográfica de los individuos analizados en las diferentes poblaciones de *Pleurodema* estudiadas mediante análisis bioacústico.

Especie	# Individuos analizados	# Cantos analizados	Temperatura agua (°C)	Localidad	Provincia
<i>Pleurodema tucumanum</i>	2	12	25	Baigorria	Córdoba
	4	12	20.1	Alpa corral	Córdoba
	6	18	18.3 – 26.3	Sampacho	Córdoba
	5	15	22.2 – 29.4	Las Rosas	Córdoba
	11	33	20.2 – 20.5	Espinillo	Córdoba
	29	87	18.8 – 24	Holmberg	Córdoba
	2	6	22.5	Río Cuarto	Córdoba
	27	80	19 – 24.2	Arroyo Tegua	Córdoba
	7	21	24	Papagayos	San Luis
	3	9	24.5	La Punilla	San Luis
	7	19	19 – 19.6	Ischigualasto	San Juan
	9	27	24.3 – 25.7	Chamical	La Rioja
	8	24	24.4 – 26.4	Patquía	La Rioja
	120	363			
<i>Pleurodema guayapae</i>	42	123	21.9 – 23.8	Patquía	La Rioja
<i>Pleurodema nebulosum</i>	10	50	19 – 19.6	Ischigualasto	San Juan
	1	15	23.2	Sampacho	Córdoba
	12	60	20.3	Aimogasta	La Rioja
	9	45	24.8 – 28.3	Patquía	La Rioja
	32	170			
<i>Pleurodema kriegi</i>	18	33	13.2 – 21.1	La Posta, Pampa de Achala	Córdoba
<i>Pleurodema cordobae</i>	29	75	18.3 – 20.1	Extremo norte de la Sierra de Comechingones	Córdoba
	4	10	13.7 – 15.8	Extremo norte de la Sierra de Comechingones	Córdoba
	33	85			
Total	245	774		17 localidades	

Los registros acústicos se digitalizaron y analizaron mediante el uso del programa Canary® 1.2 (Charif *et al.* 1995) en una computadora Performa 6400/200 Apple Macintosh™. Los cantos se digitalizaron a una tasa de muestreo de 44100 Hz con un tamaño de muestra de 16 bits. Los oscilogramas, sonogramas, y espectrogramas fueron elaborados siguiendo las especificaciones de Heyer & Reid (2003): Filter Bandwidth 649.4 Hz, Frame Length 256 puntos, Grid Resolution 128 puntos, Overlap 50%, Frequency 43.07 Hz, FFT size 1024 puntos; Window Function Hamming; Amplitude Logarithmic; Clipping Level -95 dB. Mediante la elaboración de los oscilogramas, sonogramas y espectrogramas se obtuvieron las representaciones gráficas de la intensidad del canto vs. el tiempo, la frecuencia del canto vs. el tiempo y la intensidad del canto vs. la frecuencia, respectivamente. A partir de estas gráficas se midieron las variables acústicas.

Las especies *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum* poseen cantos simples, en tanto que *P. kriegi* y *P. cordobae* poseen cantos compuestos. Por lo tanto, en cada serie de cantos de un individuo fueron analizados tres cantos, tres trenes de pulsos por canto (en los cantos compuestos) y tres pulsos por canto (tres pulsos por tren de pulso en los cantos compuestos; Littlejohn, 2001; Martino & Sinsch, 2002). En los casos de cantos simples se relevaron las siguientes variables (Fig. 30):

Duración del canto (DC): Tiempo desde el comienzo al final de la unidad acústica de vocalización. Medido desde el oscilograma. [ms]

Intervalo entre cantos (IC): Tiempo que separa un canto de otro en una serie de cantos consecutivos. Medido desde el oscilograma. [ms]

Pulsos/canto (P/C): Número de pulsos (subunidad más pequeña dentro del canto) que contiene un canto. Contados desde el oscilograma. [N]

Duración del pulso (DP): Tiempo desde el comienzo al final de la subunidad más pequeña del canto. Medido desde el oscilograma. [ms]

Intervalo entre pulsos (IP): Tiempo que separa un pulso de otro dentro de un canto. Medido desde el oscilograma. [ms]

Tasa de pulsos (TP): Cantidad de veces que entra en un segundo la suma de la duración media del pulso y del interpulso. [pulsos/s]

Frecuencia dominante (FD): Frecuencia del canto que concentra la mayor energía. Medido desde el espectrograma. [Hz]

ms= milisegundos, N= número, Pulsos/s= pulsos por segundo, Hz= Hertz

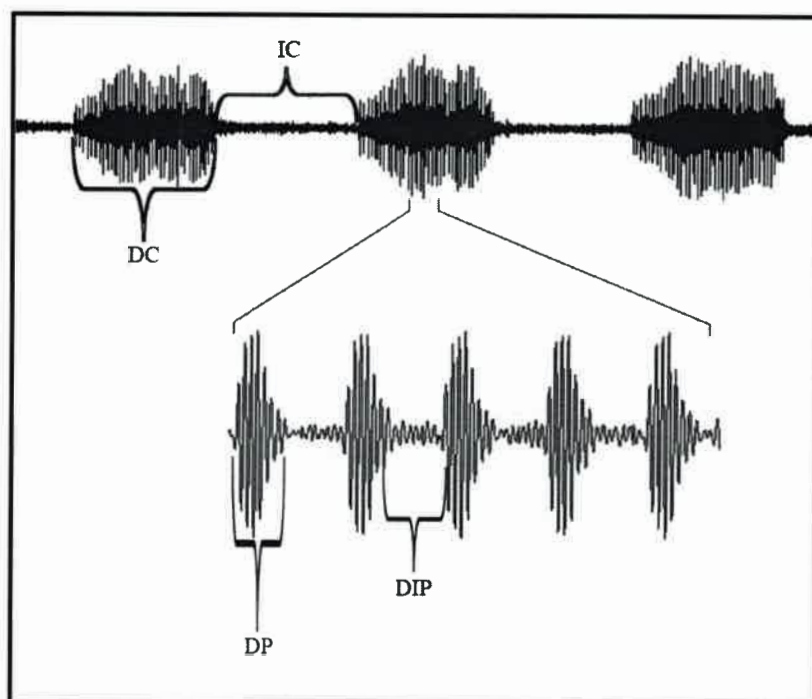


Figura 30: Oscilograma de un canto simple tipo donde se indican las variables temporales relevadas en el análisis bioacústico para *Pleurodema tucumanum*, *Pleurodema guayapae* y *P. nebulosum*. Abreviaciones ver texto.

En el caso de las especies de canto compuestos, se midieron otras variables propias de estos cantos como así también las duraciones de los tres pulsos y sus correspondientes interpulsos. Por lo tanto, las variables relevadas fueron las siguientes (Fig. 31):

Duración del canto (DC): Tiempo desde el comienzo al final de la unidad acústica de vocalización. Medido desde el oscilograma. [ms]

Intervalo entre cantos (IC): Tiempo que separa un canto de otro en una serie de cantos consecutivos. Medido desde el oscilograma. [ms]

Trenes de pulsos por canto (TP/C): Número de grupos de pulsos en que se divide un canto. Contados desde el oscilograma [N]

Duración del Tren de pulsos (DTP): Tiempo desde el comienzo al final de un grupo de pulsos en que se divide un canto. [ms]

Intervalo entre trenes de pulsos (ITP): Tiempo que separa un grupo de pulso de otro dentro de un canto. Medido desde el oscilograma. [ms]

Tasa de pulsos (TP): Cantidad de veces que entra en un segundo la suma de la duración media del pulso y del interpulso. [pulsos/s].

Tasa de trenes de pulsos (TTP): Cantidad de veces que entra en un segundo la suma de la duración media del tren de pulso y del intervalo entre trenes de pulsos. [trenes de pulsos/s].

Duración del primer pulso (D1°P) [ms]: Tiempo de la primer subunidad que conforma el tren de pulso tripulsado.

Primer intervalo entre pulsos (D1°IP) [ms]: Tiempo que separa el primer pulso del segundo en el tren de pulso tripulsado.

Duración del segundo pulso (D2°P) [ms]: Tiempo de la segunda subunidad que conforma el tren de pulso tripulsado.

Segundo intervalo entre pulsos (D2°IP) [ms]: Tiempo que separa el segundo pulso del tercero en el tren de pulso tripulsado.

Duración del tercer pulso (D3°P) [ms]: Tiempo de la tercer subunidad que conforma el tren de pulso tripulsado.

Frecuencia dominante (FD): Frecuencia del canto que concentra la mayor energía. Medido desde el espectrograma. [Hz]

ms= milisegundos, N= número, Pulsos/s= pulsos por segundo, Hz= Hertz

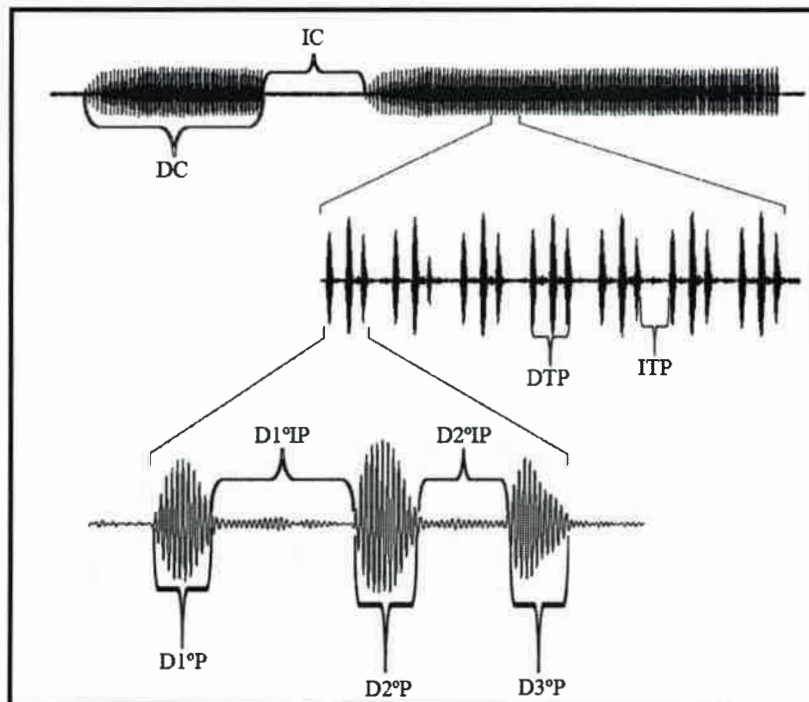


Figura 31: Oscilograma de un canto compuesto tipo donde se indican las variables temporales relevadas en el análisis bioacústico para *Pleurodema kriegi* y *P. cordobae*. Abreviaciones ver texto.

Para análisis posteriores se calcularon las medias aritméticas de cada variable por serie de canto. En las especies de canto simple, los trenes de pulsos por canto, la duración del tren de pulsos, el intervalo entre trenes de pulsos y la tasa de trenes de pulsos no se analizaron porque estas variables son exclusivas de cantos compuestos. De este modo, el set básico de datos del canto de advertencia que describe a cada especie consiste de siete variables acústicas en el caso de las especies de cantos simples y de 14 variables acústicas en el caso de las especies de cantos compuestos.

La distribución normal de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilks. En los casos en que la hipótesis de normalidad fue rechazada se trabajó con estadística no paramétrica.

Se utilizaron Análisis de Correlación Múltiple para detectar la posible asociación de las variables acústicas respecto de la temperatura del ambiente y posteriormente se cuantificaron los efectos de la temperatura en aquellas variables que resultaron temperatura-dependiente mediante Análisis de Regresión Lineal, utilizando la temperatura del agua como variable independiente y a la variable acústica de interés como variable dependiente.

Para posteriores comparaciones entre especies, las variables temperatura-dependiente en los cantos de advertencia de *Pleurodema tucumanum* y *P. nebulosum* fueron estandarizadas a 22°C utilizando el modelo de regresión previamente obtenido para cada especie y posteriormente, junto a las variables temperatura-independiente, fueron descritas mediante los estadísticos de centralización y dispersión (medias, desvío estándar, rango). En el caso de *P. guayapae*, como consecuencia de su particular modo reproductivo explosivo y a pesar de las numerosas campañas de muestreo, los registros acústicos pertenecen a dos noches consecutivas y por ende el rango de temperatura en el cual se realizaron los registros acústicos no permitió evaluar el efecto de la temperatura sobre las variables acústica. Sin embargo, el rango registrado incluye la temperatura de 22°C utilizada para estandarizar las variables en las dos restantes especies de canto simple, lo que permite una comparación entre las especies descartando el posible efecto de la mencionada variable ambiental.

Para las especies de canto compuesto se procedió de la misma manera que con las de canto simple, pero se estandarizaron las variables temperatura-dependientes a 20°C, temperatura intermedia entre los registros realizados.

Las comparaciones entre especies de canto simple y de cantos compuestos se realizaron de manera diferenciada mediante un Análisis de Componentes Principales con rotación varimax con la finalidad de evaluar la posible diferenciación bioacústica entre especies y la asociación de las variables clasificatorias respecto a los datos. Este método ortogonal de rotación reduce al mínimo el número de variables con cargas grandes en un factor, lo que mejora la capacidad de interpretación de los factores. La rotación no afecta las variaciones comunes ni el porcentaje de la varianza total explicada, sin embargo cambia el porcentaje de la varianza que explica cada factor.

Posterior al análisis exploratorio mediante Componentes Principales y a partir de sus resultados, se procedió a comparar las diferencias entre especies y la identificación de aquellas variables clasificatorias para cada especie mediante Análisis Discriminante. Finalmente, se realizaron comparaciones de a pares, entre las especies de cantos simples y de cantos compuestos en forma diferenciada, mediante test *t* o Mann Whitney para evaluar las posibles diferencias entre especies en cada variable acústica estudiada.

Los registros acústicos digitalizados se depositaron en la sonoteca de la cátedra de Ecología General, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Resultados

Pleurodema tucumanum Parker, 1927

Los registros acústicos analizados provienen de 13 localidades: Papagayos y La Punilla de la provincia de San Luis; Sampacho, Holmberg, Río Cuarto, Alpa Corral, Espinillo, Baigorria, Arroyo Tegua y Las Rosas de la provincia de Córdoba; Ischigualasto de la provincia de San Juan y Chamental y Patquía de la provincia de La Rioja (Tabla 27). El Canto de advertencia de *P. tucumanum* se clasifica como un canto simple formado por un solo grupo o tren de pulsos (Fig. 32). El número promedio de pulsos por cantos es de 34 y la intensidad de los mismos varía de acuerdo a su posición. La intensidad de los pulsos es baja al principio del canto y comienza a aumentar haciéndose mayor en los pulsos intermedios para luego disminuir al final a una intensidad semejante a los pulsos del inicio. De esta manera, la fisonomía del canto en el oscilograma se observa en forma de “huso”. La forma de cada pulso es semejante a la del canto, donde la intensidad es menor al inicio y al final del pulso y mayor en las oscilaciones intermedias. Como se puede apreciar en el sonograma, el canto no posee modulación y la frecuencia dominante promedio es 2560Hz., con una variación intraespecífica que va desde los 2271 a los 2936 Hz.

Todas las variables acústicas, a excepción del número de pulsos por canto, son temperatura-dependientes ($p < 0.05$) (Tabla 28). Estas variables mostraron una asociación similar tanto con la temperatura del agua como con la del aire.

Tabla 28: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables acústicas de *Pleurodema tucumanum* y la temperatura del aire y del agua, $n = 120$.

	Duración del canto	Intervalo entre cantos	Pulsos/canto	Frecuencia dominante	Duración del pulso	Intervalo entre pulso	Tasa de pulsos	T° Aire
T° Aire	-0.2096 *	-0.3886 **	0.1215 <i>ns</i>	0.2354 **	-0.5197 ***	-0.4382 ***	0.7094 ***	1
T° Agua	-0.1958 *	-0.5579 ***	0.1149 <i>ns</i>	0.2004 *	-0.2884 **	-0.5064 ***	0.6198 ***	0.5247 ***

Nivel de significancia: *ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

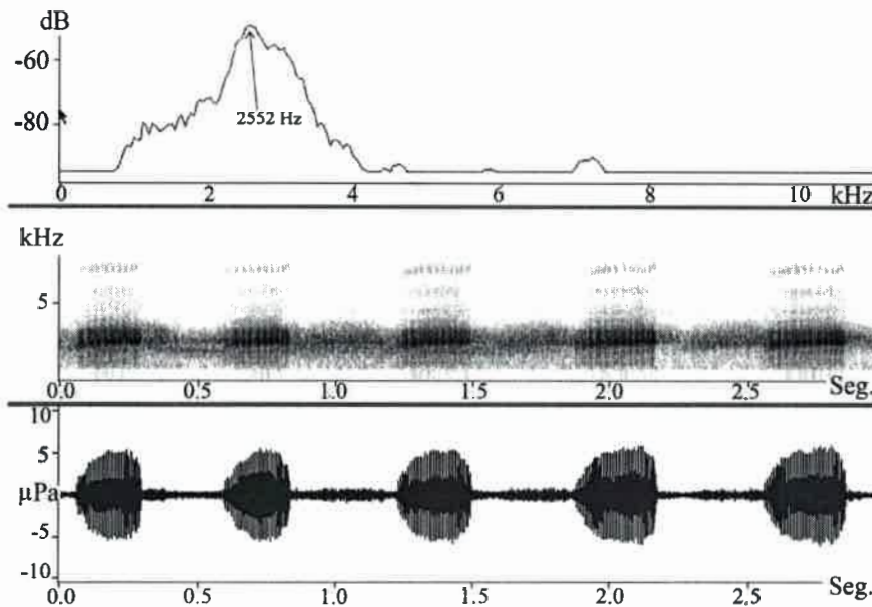


Figura 32: Canto de advertencia de *Pleurodema tucumanum*. Oscilograma, sonograma y espectrograma Temperatura del agua 25°C.

Para cada variable que resultó temperatura-dependiente, se obtuvo un modelo de regresión lineal respecto a la temperatura del agua, con el porcentaje de variabilidad atribuido a dicha variable ambiental (Tabla 29, Fig. 33).

Tabla 29: Resumen estadístico de los modelos de regresión lineal de las variables que resultaron temperatura-dependientes en *Pleurodema tucumanum* versus la Temperatura del agua.

	Coeficiente de Correlación r	Coeficiente de Regresión R ²	Modelo de regresión		
			pendiente	intercepto	nivel de significancia
Duración del canto (ms)	-0.195754	0.038319	-5.1157	391.81	0.032
Intervalo entre cantos (ms)	-0.557912	0.311265	-20.4833	855.083	0.000
Frecuencia dominante (Hz)	0.20043	0.040172	8.8841	2364.97	0.028
Duración del pulso (ms)	-0.288387	0.083167	-0.04830	3.3363	0.001
Intervalo entre pulsos (ms)	-0.50645	0.256492	-0.17744	10.0887	0.000
Tasa de pulsos (Pulsos/s.)	0.619808	0.384162	3.13529	50.6777	0.000

El número de pulsos por canto se describe mediante la media, desvío estándar y rango, mientras que las variables temperatura-dependientes previamente fueron estandarizadas a 22°C y caracterizadas mediante media, desvío estándar y rango (Tabla 30). Las variables temperatura-dependientes también son descritas por la media e intervalo de confianza según el modelo de regresión lineal obtenido a una temperatura del agua de 22°C (Tabla 31).

Tabla 30: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas temperatura-independientes (TI) y temperatura-dependientes (TD) estandarizadas a 22°C consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema tucumanum*.

VARIABLES		n Individuos/cantos/pulsos	Media ± Desvío estándar (Rango)
Duración del canto [ms]	TD	120/363	278.5 ± 67.6 (134.7 – 454.3)
Intervalo entre cantos [ms]	TD	120/359	404.5 ± 79.8 (212.3 – 651.8)
Pulsos/Canto	TI	120/363	33.9 ± 7.6 (17 – 56)
Frecuencia dominante [Hz]	TD	120/363	2560.4 ± 113.7 (2271 – 2936)
Duración del pulso [ms]	TD	120/363/1089	2.27 ± 0.42 (1.35 – 3.28)
Intervalo entre pulsos [ms]	TD	120/363/1089	6.19 ± 0.79 (4.65 – 8.05)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	TD	120/363/1089	119.7 ± 10.4 (96.0 – 150.2)

n: tamaño de la muestra.

Tabla 31: Medias y correspondientes intervalo de confianza 95% para las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema tucumanum* referidas a la temperatura del agua de 22°C.

VARIABLES	n Individuos/cantos/pulsos	Media (intervalo de confianza)
Duración del canto [ms]	120/363	278.5 (266.2 – 290.7)
Intervalo entre cantos [ms]	120/359	404.5 (390.0 – 418.9)
Frecuencia dominante [Hz]	120/363	2560.4 (2539.8 – 2581.0)
Duración del pulso [ms]	120/363/1089	2.27 (2.22 – 2.35)
Intervalo entre pulsos [ms]	120/363/1089	6.19 (6.04 – 6.33)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	120/363/1089	119.7 (117.8 – 121.5)

n: tamaño de la muestra.

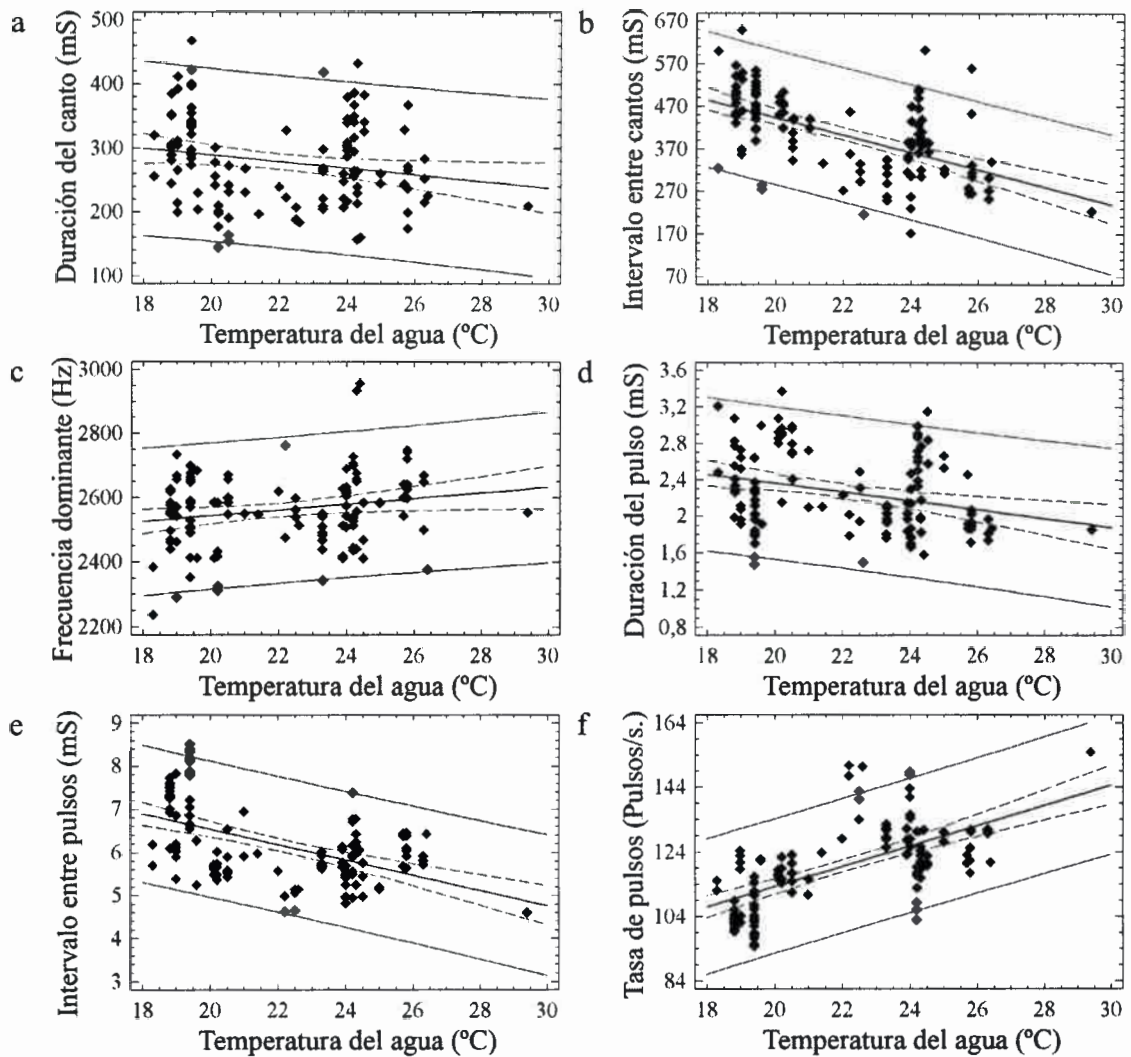


Figura 33: Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema tucumanum* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración del canto, b) Intervalo entre cantos, c) Frecuencia dominante, d) Duración del pulso, e) Intervalo entre pulsos y f) Tasa de pulsos.

Pleurodema guayapae Barrio, 1964

Los registros acústicos analizados provienen de tres sitios próximos a la localidad de Patquía, provincia de La Rioja. El Canto de advertencia de *Pleurodema guayapae*, al igual que el de *Pleurodema tucumanum*, es un canto simple formado por un solo grupo o tren de pulsos con una duración promedio de 187 ms (Fig. 34). El número promedio de pulsos por cantos es de 41 y la intensidad de los mismos varían en forma similar al descrito para *Pleurodema tucumanum*, observándose en el oscilograma la forma de “huso” en sus cantos. La forma de los pulsos en cuanto a su intensidad es similar a *Pleurodema tucumanum*. El canto de *Pleurodema guayapae* no posee modulación en su frecuencia que tiene un valor medio de 752Hz., con una variación entre individuos que va desde los 674 a los 839 Hz.

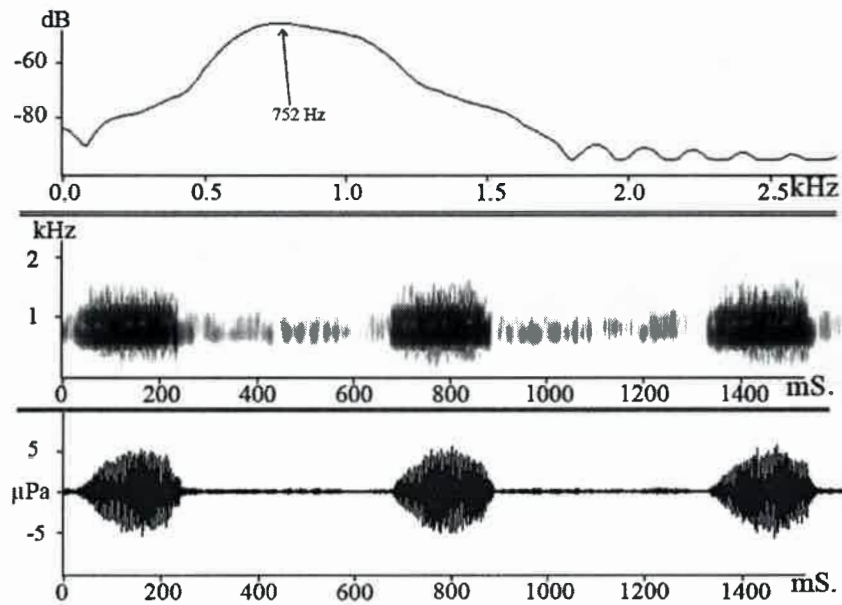


Figura 34: Canto de advertencia de *Pleurodema guayapae*. Oscilograma, sonograma y espectrograma. Temperatura del agua 20.4°C

El rango de temperatura en el cual se registraron los cantos de advertencia de *Pleurodema guayapae* (21.9 – 23.8°C, Tabla 27) no permite realizar un análisis sobre la correlación de las variables acústicas respecto a la mencionada variable ambiental. Los variables se describen mediante la media, desvío estándar y rango (Tabla 32).

Tabla 32: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema guayanae*.

Variables	n Individuos/cantos/pulsos	Media \pm Desvío estándar (Rango)
Duración del canto [ms]	42/123	186.66 \pm 16.70 (155.81 - 222.52)
Intervalo entre cantos [ms]	42/123	524.01 \pm 95.18 (303.98 - 769.92)
Pulsos/Canto	42/123	40.84 \pm 3.41 (35 - 48)
Frecuencia dominante [Hz]	42/123	752 \pm 45 (674 - 839)
Duración del pulso [ms]	42/123/369	2.68 \pm 0.21 (2.24 - 3.10)
Intervalo entre pulsos [ms]	42/123/369	1.78 \pm 0.20 (1.46 - 2.21)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	42/123	225.01 \pm 12.77 (199.47 - 256.34)

n: tamaño de la muestra

Pleurodema nebulosum (Burmeister, 1861)

Los registros acústicos analizados provienen de cuatro localidades, Ischigualasto, provincia de San Juan; Aimogasta y Patquía, provincia de La Rioja y Sampacho, provincia de Córdoba. El Canto de advertencia de *Pleurodema nebulosum*, al igual que el de *Pleurodema tucumanum* y *Pleurodema guayapae*, se clasifica como canto simple formado por un solo grupo o tren de pulsos (Fig. 35). El número promedio de pulsos por cantos es de 18 y la intensidad de los mismos varían en forma similar al descrito para *Pleurodema tucumanum* y *Pleurodema guayapae*, observándose en el oscilograma la forma de “huso” en sus cantos. La forma de los pulsos en cuanto a su intensidad es similar a la mencionada para *Pleurodema tucumanum* y *Pleurodema guayapae*. El canto de *Pleurodema nebulosum*, a diferencia de las dos especies mencionadas anteriormente, posee modulación en su frecuencia que tiene un valor medio de 2412Hz. en su mayor intensidad. El canto comienza con los pulsos de menor frecuencia y ésta comienza a elevarse progresivamente hacia los pulsos finales. La Frecuencia dominante del canto tiene una variación entre individuos que van desde los 2151 Hz. hasta los 2676 Hz.

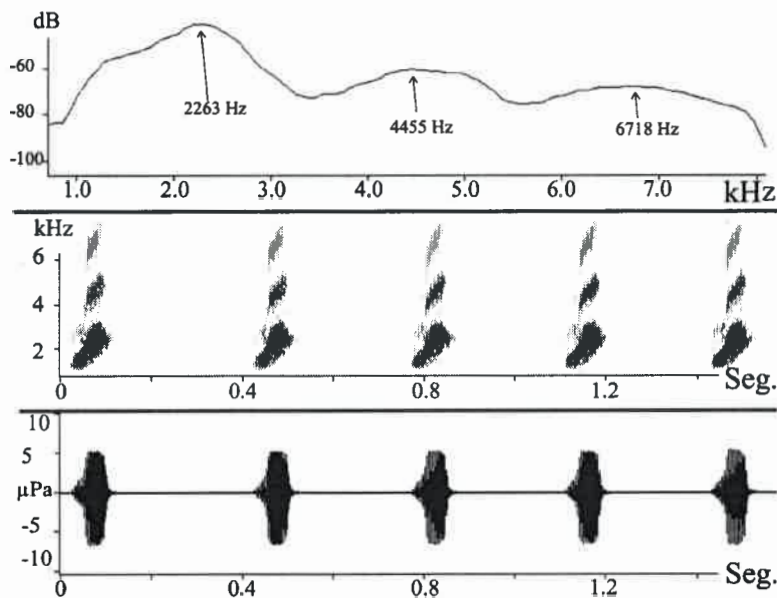


Figura 35: Canto de advertencia de *Pleurodema nebulosum*. Oscilograma, sonograma y espectrograma Temperatura del agua 23.3°C, Sampacho, Córdoba.

Todas las variables excepto el “Intervalo entre pulsos” resultaron temperatura-dependientes (Tabla 33). Para cada variable que resultó temperatura-dependiente, se obtuvo un modelo de regresión lineal respecto a la temperatura del agua, con el porcentaje de variabilidad atribuido a dicha variable ambiental (Tabla 34, Fig. 36).

Tabla 33: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables acústicas de *Pleurodema nebulosum* y la temperatura del aire y del agua, n = 32.

	Duración del canto	Intervalo entre cantos	Pulsos/canto	Frecuencia dominante	Duración del pulso	Intervalo entre pulso	Tasa de pulsos	T° Aire
T° Aire	-0.5315 **	-0.4721 **	-0.3910 *	0.1622 <i>ns</i>	-0.3440 <i>ns</i>	-0.3617 *	0,5199 **	1
T° Agua	-0.5787 ***	-0.4548 **	-0.5396 *	0.4015 *	-0.4031 *	-0.1731 <i>ns</i>	0.4344 *	0.0388 <i>ns</i>

Nivel de significancia: *ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabla 34: Resumen estadístico de los modelos de regresión lineal de las variables que resultaron temperatura-dependientes en *Pleurodema nebulosum* versus la Temperatura del agua.

	Coeficiente de Correlación r	Coeficiente de Regresión R ²	Modelo de regresión		
			pendiente	intercepto	nivel de significancia
Duración del canto (ms)	-0.578688	0.33488	-2.69021	135.375	0.001
Intervalo entre cantos (ms)	-0.454758	0.206805	-5.95373	377.307	0.010
Pulsos/Canto	-0.539601	0.291169	-0.507581	28.6444	0.001
Frecuencia dominante (Hz)	0.401458	0.161168	18.8899	1996.43	0.023
Duración del pulso (ms)	-0.403055	0.162453	-0.024560	2.5108	0.022
Tasa de pulsos (Pulsos/s.)	0.434413	0.188715	2.25796	197.066	0.013

La variable “Intervalo entre pulsos”, que resultó temperatura-independiente, se describe mediante la media, desvío estándar y rango, mientras que las demás variables resultantes temperatura-dependientes previamente fueron estandarizadas a 22°C y caracterizadas mediante media, desvío estándar y rango (Tabla 35). Las variables temperatura-dependientes también son descritas por la media e intervalo de confianza según el modelo de regresión lineal obtenido a una temperatura del agua de 22° (Tabla 36).

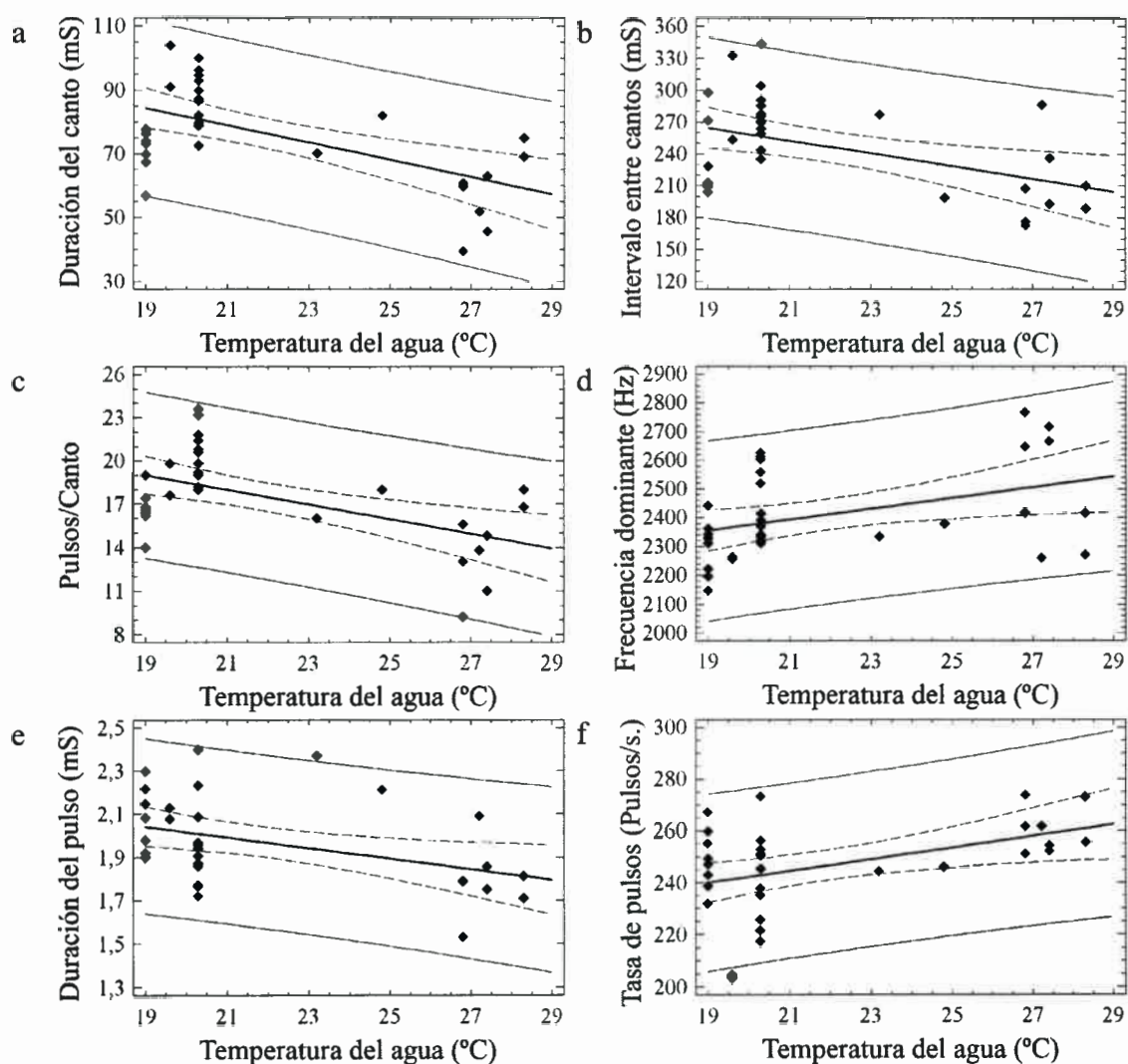


Figura 36: Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema nebulosum* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración del canto, b) Intervalo entre cantos, c) Pulsos/Canto, d) Frecuencia dominante, e) Duración del pulso y f) Tasa de pulsos.

Tabla 35: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas temperatura-independientes (TI) y temperatura-dependientes (TD) estandarizadas a 22°C consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema nebulosum*.

Variables		n Individuos/cantos/pulsos	Media ± Desvío estándar (Rango)
Duración del canto [ms]	TD	32/158	76.19 ± 12.94 (48.69 – 97.48)
Intervalo entre cantos [ms]	TD	32/158	246.32 ± 39.80 (186.35 – 333.24)
Pulsos/Canto	TD	32/158	17.48 ± 2.70 (11 – 23)
Frecuencia dominante [Hz]	TD	32/158	2412 ± 147.1 (2151 – 2676)
Duración del pulso [ms]	TD	32/158/244	1.97 ± 0.19 (1.65 - 2.40)
Intervalo entre pulsos [ms]	TI	32/158/244	2.11 ± 0.28 (1.63 - 2.83)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	TD	32/158	246.74 ± 15.98 (208.89 - 277.21)

n: tamaño de la muestra

Tabla 36: Medias y correspondientes intervalo de confianza 95% para las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema nebulosum* referidas a la temperatura del agua de 22°C

Variables		n Individuos/cantos/pulsos	Media (intervalo de confianza)
Duración del canto [ms]		32/158	76.19 (71.44 – 80.94)
Intervalo entre cantos [ms]		32/158	246.32 (231.72 – 260.94)
Pulsos/Canto		32/158	17.48 (16.50 – 18.48)
Frecuencia dominante [Hz]		32/158	2412 (2358 – 2466)
Duración del pulso [ms]		32/158/244	1.97 (1.90 – 2.04)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]		32/158/244	246.74 (240.88 – 252.60)

n: tamaño de la muestra

Pleurodema kriegi (Müller, 1926).

El Canto de advertencia de *Pleurodema kriegi* corresponde a un canto compuesto, formado por grupos o trenes de pulsos tripulsados separados por intervalos relativamente constantes (Fig. 37 y 38). En forma contraria a lo sucedido respecto al número constante de pulsos por tren de pulso, el número de trenes de pulsos por cantos es muy variable en estrecha relación a la gran variabilidad mostrada por la duración del canto. En el oscilograma de la Figura 37 se puede observar que los primeros trenes de pulsos poseen una intensidad baja que aumenta progresivamente en los primeros diez trenes hasta alcanzar la mayor intensidad y mantenerse en forma constante hasta el final del canto. Cada tren de pulso comienza con un pulso de baja intensidad seguido por un segundo pulso con intensidad máxima y posteriormente el tercer pulso disminuye nuevamente la intensidad hacia valores semejante a los del primer pulso. Siempre la separación del primer pulso con el segundo es mayor en relación al intervalo entre el segundo y tercer pulso. El comportamiento de la intensidad de los pulsos y la separación de los mismos se mantienen constantes a lo largo de todo el canto. En la mayoría de los cantos no se observa modulación. Solo algunos cantos mostraron una pequeña modulación ascendente en los primeros trenes de pulsos para luego mantener la frecuencia constante durante el resto de la emisión del canto. La frecuencia dominante promedio del canto se encuentra a los 1847 Hz, con una variación entre individuos que va desde los 1660 a 2023 Hz.

El número de trenes de pulsos por canto, y por ende la duración del canto, poseen una variación individual muy notoria a diferencia de la duración de los trenes de pulsos y sus intervalos que mantienen las mismas características sin depender de la duración que posea cada canto. Por lo tanto, se describen las variables duración del canto, intervalo entre cantos y el número de trenes de pulsos por canto pero no se consideran en el posterior análisis acústico comparativo con *Pleurodema cordobae*. Estas tres variables, junto a la frecuencia dominante y la duración del pulso, no resultaron temperatura-dependientes (Tabla 37).

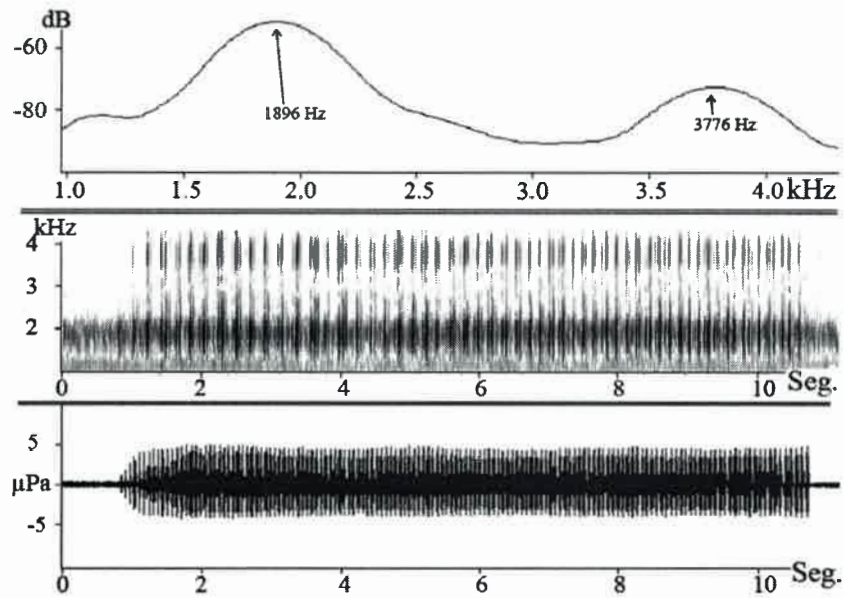


Figura 37: Canto de advertencia de *Pleurodema kriegi*. Oscilograma, sonograma y espectrograma. La Posta, Córdoba. Temperatura del agua 20.7°C.



Figura 38: Oscilograma de fragmento del canto de advertencia de *Pleurodema kriegi* mostrando tres trenes de pulsos con tres pulsos cada uno. La Posta, Córdoba. Temperatura del agua 20.7°C.

El análisis de las variables de los trenes de pulsos arrojó que las duraciones del 1° 2° y 3° pulso son independientes a la temperatura, mientras que los dos intervalos son temperatura-dependientes (Tabla 38).

Tabla 37: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables acústicas de *Pleurodema kriegi* y la temperatura del aire y del agua, n = 18.

	Duración del canto	Intervalo entre cantos	Trenes Pulsos/canto	FD	Duración trenes pulsos	Duración intertrenes	Duración del pulso	Intervalo entre pulso	Tasa de pulsos	Tasa de trenes
T°	0.2452	0.0923	0.2491	0.0121	-0.6893	-0.5316	-0.0332	-0.6496	0.6660	0.6176
Aire	ns	ns (n=7)	ns	ns	**	*	ns	**	**	**
T°	0.0071	0.1571	0.0633	-0.027	-0.8615	-0.7109	0.0678	-0.8487	0.8411	0.8018
Agua	ns	ns (n=7)	ns	ns	***	***	ns	***	***	***

Nivel de significancia: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabla 38: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables acústicas de pulsos de *Pleurodema kriegi* y la temperatura del aire y del agua, n = 18.

	Duración del pulso 1	Duración del pulso 2	Duración del pulso 3	Intervalo entre pulso 1	Intervalo entre pulso 2
T° Aire	-0.0364 <i>ns</i>	-0.0178 <i>ns</i>	-0.0525 <i>ns</i>	-0.7389 ***	-0.5197 *
T° Agua	-0.1049 <i>ns</i>	0.1507 <i>ns</i>	-0.0304 <i>ns</i>	-0.8399 ***	-0.8115 ***

Nivel de significancia: *ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para cada variable que resultó temperatura-dependiente, se obtuvo un modelo de regresión lineal respecto a la temperatura del agua, con el porcentaje de variabilidad atribuido a dicha variable ambiental (Tabla 39; Fig. 39).

Tabla 39: Resumen estadístico de los modelos de regresión lineal de las variables que resultaron temperatura-dependientes en *Pleurodema kriegi* versus la Temperatura del agua.

	Coeficiente de Correlación r	Coeficiente de Regresión R ²	Modelo de regresión		
			pendiente	intercepto	nivel de significancia
Duración de trenes de pulsos (ms)	-0.861512	0.742203	-1.57321	74.1167	0.0000
Duración intertrenes de pulsos (ms)	-0.710907	0.505388	-1.60322	65.1117	0.0009
Tasa de pulsos (Pulsos/s.)	0.841122	0.707486	1.85641	17.9532	0.0000
Tasa de trenes de pulsos (trenes de pulsos/s.)	0.801813	0.642904	0.441157	4.48543	0.0001
Intervalo entre pulsos 1 (ms)	-0.839916	0.705459	-0.805383	30.7853	0.0000
Intervalo entre pulsos 2 (ms)	-0.811545	0.658606	-0.736934	26.3162	0.0000

Las variables temperatura-independientes se describen mediante los valores medios, su desvío estándar y rango, mientras aquellas variables que resultaron temperatura-dependientes se estandarizaron utilizando el modelo de regresión obtenido para cada variable a una temperatura del agua de 20°C. Los valores resultantes se muestran en las Tablas 40 y 41. Las variables temperatura-dependientes también son descritas por la media e intervalo de confianza utilizando el modelo de regresión lineal obtenido a una temperatura del agua de 20° (Tabla 42).

Tabla 40: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas temperatura-independientes (TI) y temperatura-dependientes (TD) estandarizadas a 20°C consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema kriegi*.

Variable	n		Media ± Desvío estándar (Rango)
	Individuos/Cantos/ Trenes de Pulsos/Pulsos		
Duración del canto [ms]	18/35	TI	11593.9 ± 10602.4 (1628.95 – 38387.0)
Intervalo entre cantos [ms]	7/16	TI	5374.41 ± 3392.62 (1669.0 – 10091.3)
Frecuencia dominante [Hz]	18/35	TI	1846.75 ± 90.4073 (1660 – 2023)
Trenes de Pulsos/Canto	18/35	TI	142.315 ± 141.1 (20 - 498)
Duración del tren de pulso [ms]	18/35/105	TD	42.65 ± 2.39 (39.57 – 49.23)
Intervalo entre trenes de pulsos [ms]	18/35/105	TD	33.05 ± 4.09 (27.07 – 39.69)
Duración del pulso [ms]	18/35/105/315	TI	5.15 ± 0.72 (3.79 – 6.14)
Intervalo entre pulsos [ms]	18/35/105/315	TD	13.13 ± 1.24 (11.42 – 14.92)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	18/35/105/315	TD	55.08 ± 3.08 (47.83 – 59.59)
Tasa de trenes de pulsos [Trenes de pulsos/s.]	18/35/105	TD	13.31 ± 0.85 (12.05 – 14.88)

n= tamaño de la muestra

Tabla 41: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas del tren de pulso temperatura-independientes (TI) y temperatura-dependientes (TD) estandarizadas a 20°C consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema kriegi*.

Variable	n		Media ± Desvío estándar (Rango)
	Individuos/Cantos/Pulsos		
Duración del pulso 1 [ms]	18/35/105	TI	4.78 ± 0.63 (3.56 – 5.86)
Duración del pulso 2 [ms]	18/35/105	TI	5.44 ± 0.77 (4.12 – 6.58)
Duración del pulso 3 [ms]	18/35/105	TI	5.22 ± 1.19 (3.42 – 7.42)
Intervalo entre pulsos 1 [ms]	18/35/105	TD	14.68 ± 1.34 (12.88 – 17.51)
Intervalo entre pulsos 2 [ms]	18/35/105	TD	11.58 ± 1.37 (9.63 – 13.69)

n= tamaño de la muestra

Tabla 42: Medias y correspondientes intervalo de confianza 95% para las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema kriegi* referidas a la temperatura del agua de 20°C.

Variables	n		Media
	Individuos/cantos/pulsos		(intervalo de confianza)
Duración del tren de pulso [ms]	18/35/105		42.65 (41.37 – 43.93)
Intervalo entre trenes de pulsos [ms]	18/35/105		33.05 (30.86 – 35.23)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	18/35/105/315		55.08 (53.44 – 56.73)
Tasa de trenes de pulsos [Trenes de pulsos/s.]	18/35/105		13.31 (12.86 – 13.76)
Intervalo entre pulsos 1 [ms]	18/35/105		14.68 (13.96 – 15.39)
Intervalo entre pulsos 2 [ms]	18/35/105		11.58 (10.85 – 12.31)

n: tamaño de la muestra.

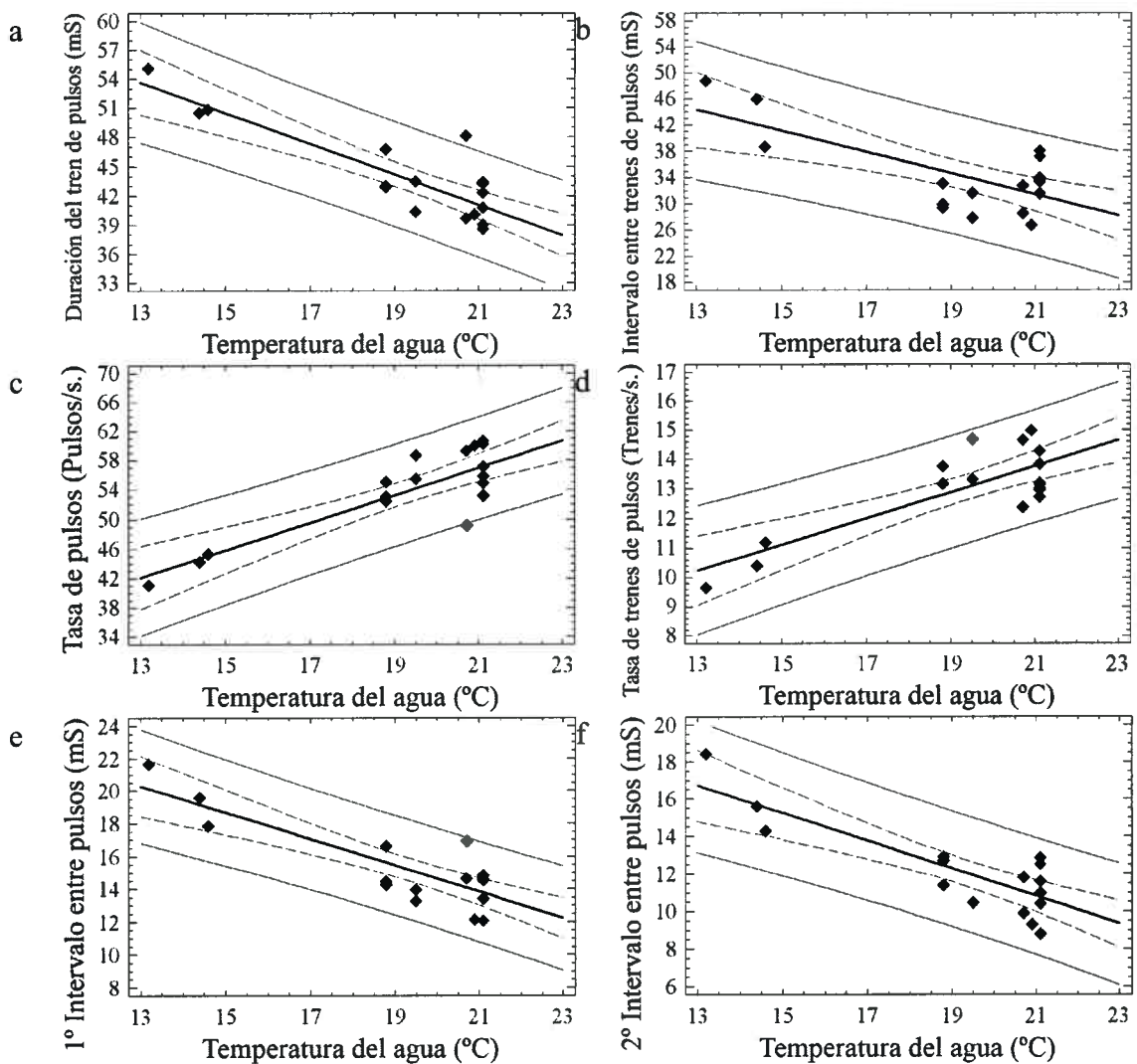


Figura 39: Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema kriegi* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración de trenes de pulsos, b) Duración intertrenes de pulsos, c) Tasa de pulsos, d) Tasa de trenes de pulsos, e) Primer intervalo entre pulsos, f) Segundo intervalo entre pulsos.

***Pleurodema cordobae* Valetti, Salas y Martino, 2009.**

El Canto de advertencia de *Pleurodema cordobae*, al igual que el de *Pleurodema kriegi*, corresponde a un canto compuesto, formado por grupos o trenes de pulsos tripulsados (Fig. 40 y 41). El comportamiento de la intensidad de los trenes de pulsos a lo largo del canto y de los pulsos dentro del tren de pulsos es similar al descrito para *Pleurodema kriegi*, de la misma manera que la separación del primer pulso con el segundo que es mayor en relación al intervalo entre el segundo y tercer pulso. En la mayoría de los cantos no se observa modulación. Solo algunos cantos mostraron una pequeña modulación ascendente en los primeros trenes de pulsos para luego mantener la frecuencia constante durante el resto de la emisión del canto. La frecuencia dominante promedio del canto se encuentra a los 1772 Hz, con una variación entre individuos que van desde los 1616 a 2002 Hz.

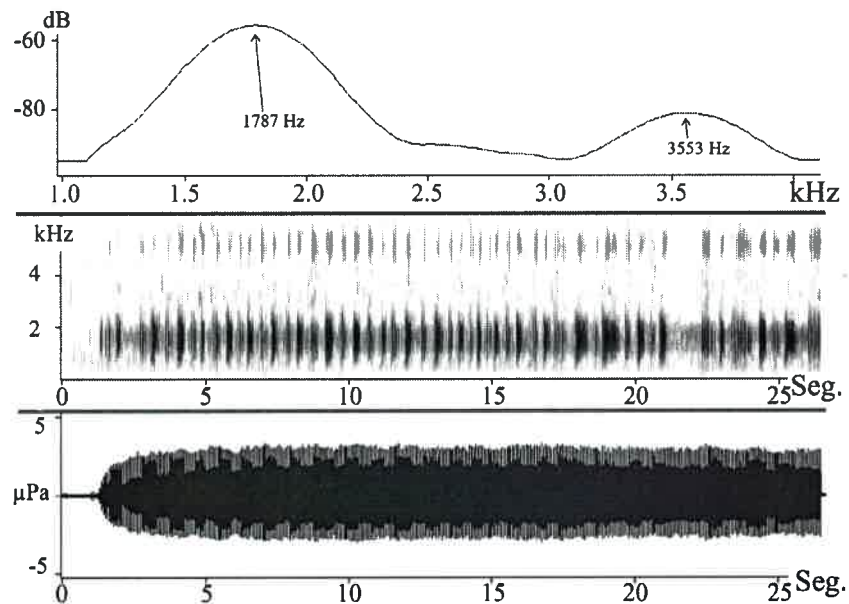


Figura 40: Canto de advertencia de *Pleurodema cordobae*. Oscilograma, sonograma y espectrograma. Los Tabaquillos, Córdoba. Temperatura del agua 19.3°C

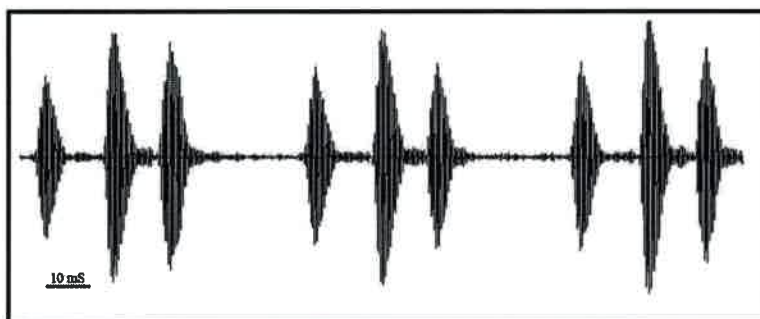


Figura 41: Oscilograma de fragmento del Canto de advertencia de *Pleurodema cordobae* mostrando tres trenes de pulsos con tres pulsos cada uno. Los Tabaquillos, Córdoba. Temperatura del agua 19.3°C

La duración del canto, el intervalo entre cantos, el número de trenes por cantos y la frecuencia dominante fueron las variables que no resultaron temperatura-dependientes (Tabla 43) y el análisis de las variables de los trenes de pulsos arrojó que todas sus variables son temperatura-dependientes (Tabla 44).

Tabla 43: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables acústicas de *Pleurodema cordobae* y la temperatura del aire y del agua, n = 33.

	Duración del canto	Intervalo entre cantos	Trenes Pulsos/canto	FD	Duración trenes pulsos	Duración intertrenes	Duración del pulso	Intervalo entre pulso	Tasa de pulsos	Tasa de trenes
T° Aire	-0.2964 <i>ns</i>	-0.0576 <i>ns</i>	-0.2847 <i>ns</i>	0.4598 **	-0.4915 **	0.0750 <i>ns</i>	-0.6708 ***	0.0071 <i>ns</i>	0.3522 *	0.1773 <i>ns</i>
		(n=26)								
T° Agua	-0.2532 <i>ns</i>	0.0280 <i>ns</i>	-0.2363 <i>ns</i>	0.1811 <i>ns</i>	-0.8917 ***	-0.3990 *	-0.5809 ***	-0.6043 ***	0.8235 ***	0.6680 ***
		(n=26)								

Nivel de significancia: *ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabla 44: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables acústicas de pulsos de *Pleurodema cordobae* y la temperatura del aire y del agua, n = 33.

	Duración del pulso 1	Duración del pulso 2	Duración del pulso 3	Intervalo entre pulso 1	Intervalo entre pulso 2
T° Aire	-0.7495 ***	-0.6796 ***	-0.3710 *	0.0118 <i>ns</i>	0.0304 <i>ns</i>
T° Agua	-0.5473 ***	0.5848 ***	-0.4559 **	0.6128 ***	-0.5635 ***

Nivel de significancia: *ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Para cada variable que resultó temperatura-dependiente, se obtuvo un modelo de regresión lineal respecto a la temperatura del agua, con el porcentaje de variabilidad atribuido a dicha variable ambiental (Tabla 45, Fig. 42).

Tabla 45: Resumen estadístico de los modelos de regresión lineal de las variables que resultaron temperatura-dependientes en *Pleurodema cordobae* versus la Temperatura del agua.

	Coeficiente de Correlación r	Coeficiente de Regresión R ²	Modelo de regresión		
			pendiente	intercepto	nivel de significancia
Duración de trenes de pulsos (ms)	-0.891696	0.795121	-1.89305	72.3052	0.0000
Duración intertrenes de pulsos (ms)	-0.399032	0.159227	-1.33765	62.1827	0.0214
Tasa de pulsos (Pulsos/s.)	0.823495	0.678144	2.88988	9.08422	0.0000
Tasa de trenes de pulsos (trenes de pulsos/s.)	0.668049	0.446289	0.531011	3.70277	0.0000
Duración del pulso 1 (ms)	-0.547296	0.299533	-0.329104	10.2297	0.0010
Duración del pulso 2 (ms)	-0.584816	0.34201	-0.345314	10.9567	0.0004
Duración del pulso 3 (ms)	-0.455894	0.207839	-0.214389	8.48144	0.0077
Intervalo entre pulsos 1 (ms)	-0.612783	0.375503	-0.630299	24.9169	0.0002
Intervalo entre pulsos 2 (ms)	-0.563498	0.31753	-0.464102	18.8244	0.0006

Las variables temperatura-independientes se describen mediante los valores medios, su desvío estándar y rango, mientras aquellas variables que resultaron temperatura-dependientes se estandarizaron utilizando el modelo de regresión obtenido para cada variable a una temperatura del agua de 20°C. Los valores resultantes se muestran en las Tablas 46 y 47.

Tabla 46: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas temperatura-independientes (TI) y temperatura-dependientes (TD) estandarizadas a 20°C consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema cordobae*.

Variable	n		Media ± Desvío estándar (Rango)
	Individuos/Cantos/Trenes de pulsos/Pulsos		
Duración del canto [ms]	33/85	TI	9754.68 ± 7136.54 (1607.0 – 39924.0)
Intervalo entre cantos [ms]	26/58	TI	2593.26 ± 1216.04 (1062.59 – 5831.5)
Frecuencia dominante [Hz]	33/85	TI	1771.91 ± 94.46 (1616 – 2002)
Trenes de Pulsos/Canto	33/85	TI	128.45 ± 85.03 (24 - 468)
Duración del tren de pulso [ms]	33/85/255	TD	34.44 ± 1.57 (31.25 – 38.33)
Intervalo entre trenes de pulsos [ms]	33/85/255	TD	35.4297 ± 5.04 (28.08 – 53.21)
Duración del pulso [ms]	33/85/255/765	TD	10.93 ± 1.18 (11.43 – 13.68)
Intervalo entre pulsos [ms]	33/85/255/765	TD	2.11 ± 0.28 (1.63 - 2.83)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	33/85/255/765	TD	66.88 ± 3.26 (59.86 – 74.19)
Tasa de trenes de pulsos [Trenes de pulsos/s.]	33/85/255	TD	14.32 ± 0.96 (12.16 – 16.23)

n= tamaño de la muestra

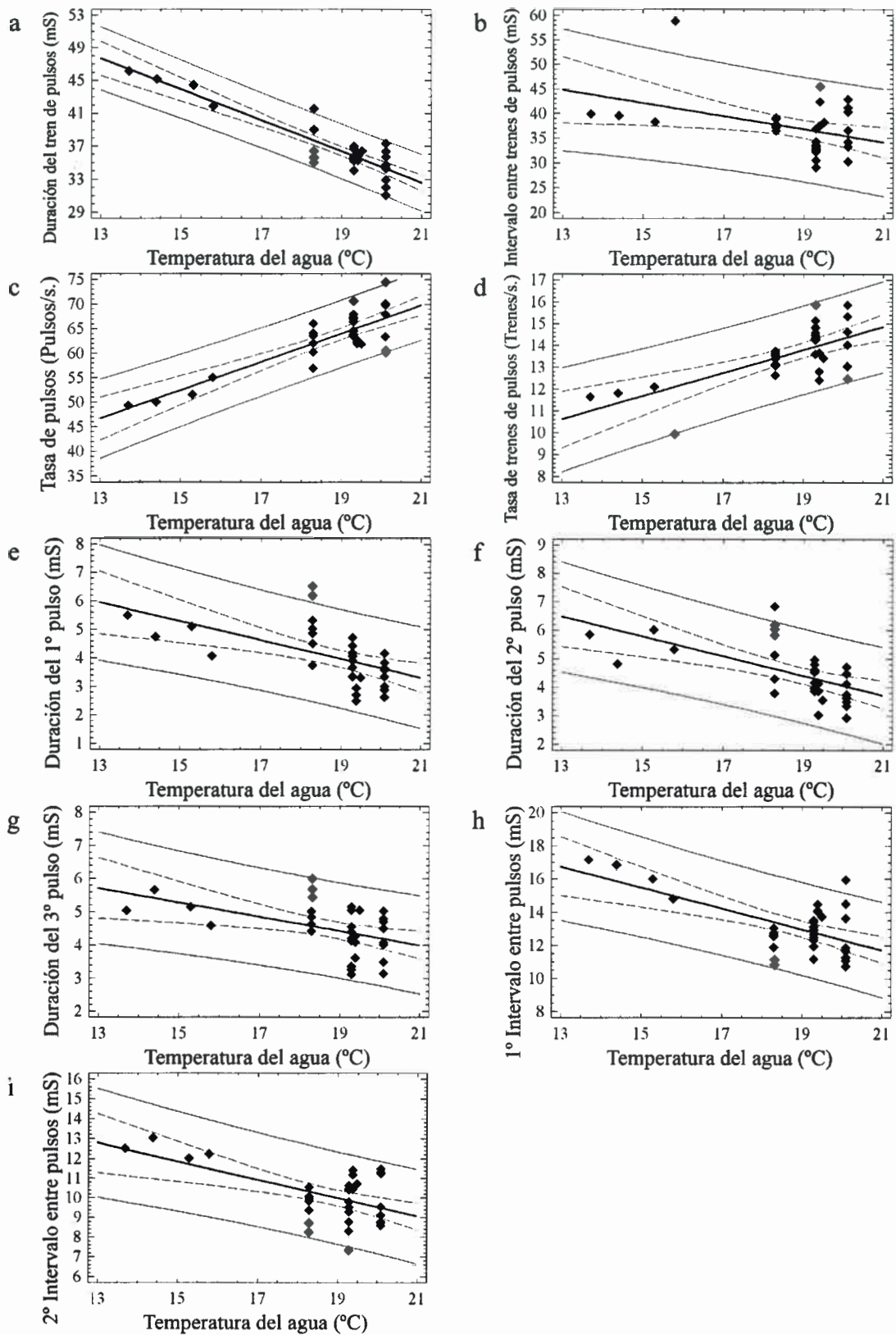


Figura 42: Regresiones lineales de las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema cordobae* versus temperatura del agua y los correspondientes intervalos de confianza y predicción del 95%. a) Duración de trenes de pulsos, b) Intervalo entre trenes de pulsos, c) Tasa de pulsos, d) Tasa de trenes de pulsos, e) Duración del pulso 1, f) Duración del pulso 2, g) Duración del pulso 3, h) Primer intervalo entre pulsos, i) Segundo intervalo entre pulsos.

Las variables temperatura-dependientes también son descriptas por la media e intervalo de confianza utilizando el modelo de regresión lineal obtenido a una temperatura del agua de 20°C (Tabla 48).

Tabla 47: Medias y correspondientes desvíos estándar de las variables acústicas del tren de pulso temperatura-dependientes (TD) estandarizadas a 20°C consideradas en el análisis del canto de advertencia de *Pleurodema cordobae*.

Variable	n		Media ± Desvío estándar (Rango)
	Individuos/Cantos/Pulsos		
Duración del pulso 1 [ms]	33/85/255	TD	3.66 ± 0.82 (2.30 – 5.98)
Duración del pulso 2 [ms]	33/85/255	TD	4.03 ± 0.79 (2.78 – 6.21)
Duración del pulso 3 [ms]	33/85/255	TD	4.12 ± 0.69 (2.91 – 5.52)
Intervalo entre pulsos 1 [ms]	33/85/255	TD	12.16 ± 1.35 (9.50 – 16.01)
Intervalo entre pulsos 2 [ms]	33/85/255	TD	9.37 ± 1.13 (6.91 – 11.54)

n= tamaño de la muestra

Tabla 48: Medias y correspondientes intervalo de confianza 95% para las variables acústicas temperatura-dependientes de *Pleurodema cordobae* referidas a la temperatura del agua de 20°C.

Variabes	n	Media (intervalo de confianza)
	Individuos/cantos/pulsos	
Duración del tren de pulso [ms]	33/85/255	34.44 (33.73 – 35.16)
Intervalo entre trenes de pulsos [ms]	33/85/255	35.43 (33.13 – 37.73)
Tasa de pulsos [Pulsos/s.]	33/85/255/765	66.88 (65.39 – 68.37)
Tasa de trenes de pulsos [Trenes de pulsos/s.]	33/85/255	14.32 (13.88 – 14.76)
Duración del pulso 1 [ms]	33/85/255	3.66 (3.27 – 4.02)
Duración del pulso 2 [ms]	33/85/255	4.03 (3.69 – 4.41)
Duración del pulso 3 [ms]	33/85/255	4.12 (3.88 – 4.51)
Intervalo entre pulsos 1 [ms]	33/85/255	12.16 (11.70 – 12.92)
Intervalo entre pulsos 2 [ms]	33/85/255	9.37 (9.04 – 10.05)

n: tamaño de la muestra.

Comparaciones interespecíficas

De acuerdo al análisis del canto de advertencia del género *Pleurodema* realizado en este estudio, se observa que en tres especies (*Pleurodema tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum*) las emisiones acústicas corresponden a cantos simples, en tanto que *P. cordobae* y *P. kriegi* poseen cantos compuestos. Por lo tanto, el análisis comparativo entre las especies se realizó teniendo en cuenta estas diferencias ya que hay variables propias de los cantos compuestos que están ausentes en los cantos simples.

Cantos simples

Las variables que resultaron temperatura-dependientes en las especies de cantos simples fueron estandarizadas a una temperatura de 22°C según los modelos de regresión lineal obtenidos para cada una de ellas. Aquellas variables temperatura-independientes se cargaron con los valores medios de sus individuos.

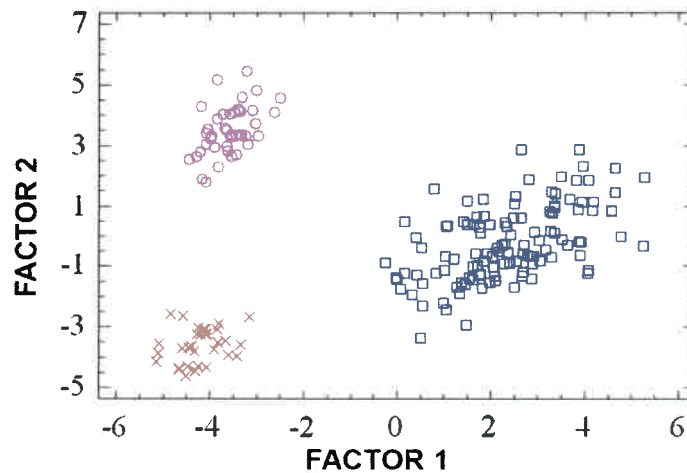
El Análisis de Componentes Principales con rotación de Varimax realizado con las variables acústicas de las tres especies de canto simple arrojó dos Factores con eigenvalores >1. Estos dos Factores explican el 80.69% de la varianza total (Tabla 49). Las variables de mayor peso en el primer Factor son Intervalo entre pulsos, Tasa de pulsos y Duración del canto, en tanto que Intervalo entre cantos, Pulsos/canto y Frecuencia dominante (FD) son las variables más importantes en el segundo Factor (Tabla 49, Fig. 43b).

Tabla 49: Eigenvectores, eigenvalores y porcentaje de varianza explicada para los dos Factores con eigenvalores >1 resultantes del Análisis de Componentes Principales, luego de la rotación varimax, para los datos de bioacústica de las tres especies de *Pleurodema* de canto simple (*P. tucumanum*, *P. nebulosum* y *P. guayapae*).

Variable	Factor 1	Factor 2
Duración del canto (DC)	0.8799	0.3963
Intervalo entre cantos (IC)	0.0968	0.8195
Pulsos/canto (P/C)	0.3491	0.8148
Frecuencia dominante (FD)	0.6415	-0.7154
Duración del pulso (DP)	-0.1600	0.6424
Intervalo entre pulsos (IP)	0.9709	-0.1574
Tasa de pulsos (TP)	-0.9597	-0.0037
Eigenvalor	3.20644	2.44171
Porcentaje de varianza	45.806	34.882

En el gráfico de dispersión del primer Factor versus el segundo para los individuos de las tres especies de canto simple se observa la distribución de los datos en tres grupos. Cada grupo corresponde a una especie (Fig 43a). El Factor 1 segrega a *Pleurodema tucumanum* de las restantes especies y el Factor 2 segrega *P. guayapae* de *P. nebulosum*. Estos resultados estarían indicando que *P. tucumanum* se diferencia de *P. nebulosum* y *P. guayapae* principalmente por poseer una menor tasa de pulsos y cantos más largos. Por otro lado, *P. nebulosum* se diferenciaría principalmente de *P. guayapae* por poseer una mayor frecuencia y un menor número de pulsos por canto.

a



b

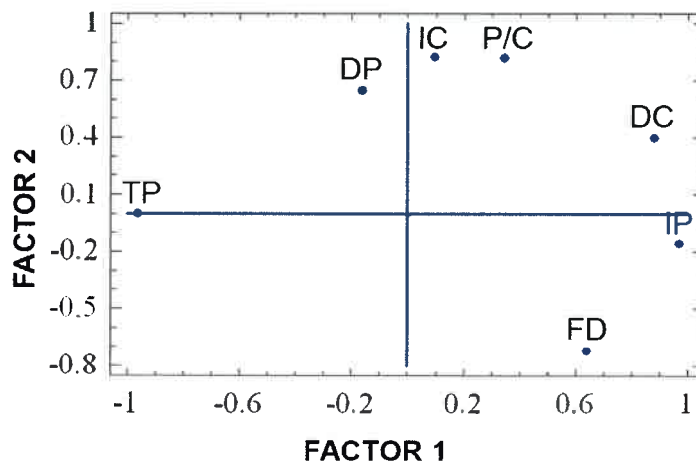


Figura 43: a) Diagrama de dispersión de los valores de los dos primeros Componentes Principales para *P. tucumanum* (□), *P. nebulosum* (×) y *P. guayapae* (○). Los eigenvalores, eigenvectores y el porcentaje de varianza explicada por cada Componente se muestran en la Tabla 49. b) Diagrama de dispersión de las variables bioacústicas sobre los primeros dos Componentes.

El Análisis Discriminante, que maximiza las diferencias entre las especies, ratifica en forma esperada lo observado en el Análisis de Componentes Principales (Fig. 44), donde las dos funciones obtenidas poseen un alto valor de correlación canónica y bajo valor de Lambda de Wilks (Tabla 50) indicando un alto poder discriminante de las funciones generadas y un alto poder discriminatorio de las variables que las componen, respectivamente.

Tabla 50: Funciones Discriminantes basadas en variables bioacústicas para distinguir las tres especies de *Pleurodema* de canto simple.

Función Discriminante	Eigenvalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica	Lambda de Wilks	χ^2	g.l.	Significancia
1	61.7408	79.30	0.992	0.0009	1312.092	14	$p < 0.0001$
2	16.1192	20.70	0.970	0.0584	533.958	6	$p < 0.0001$

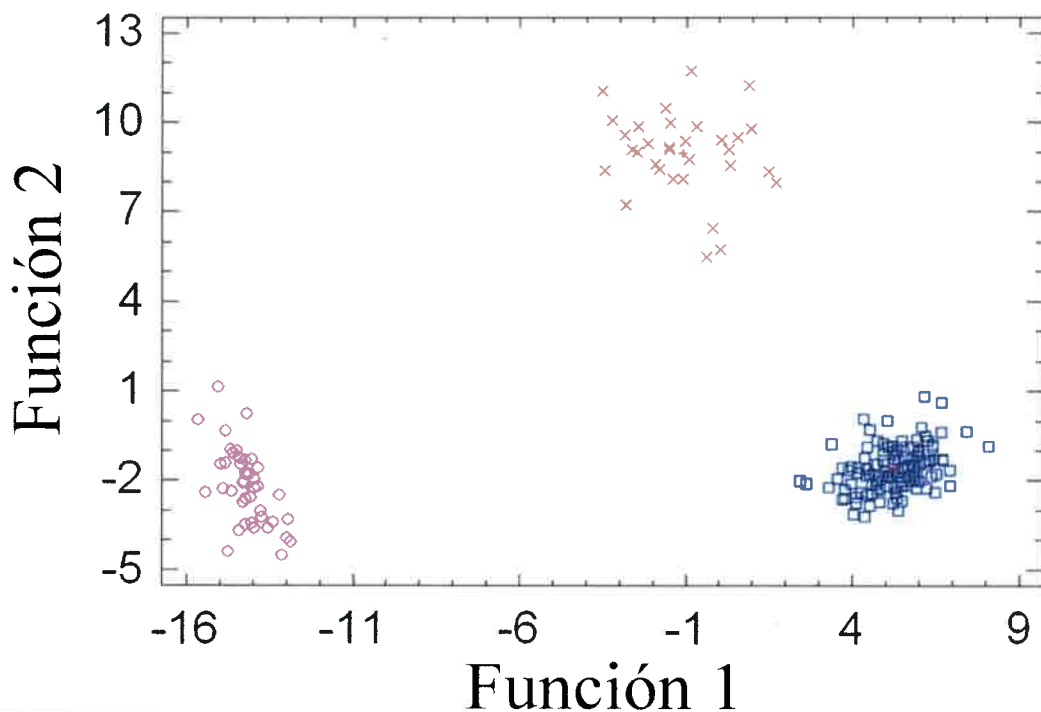


Figura 44: Diagrama de dispersión de los valores de las dos Funciones Discriminantes basadas en variables bioacústicas para *P. tucumanum* (□), *P. nebulosum* (×) y *P. guayapae* (◊)

Todos los individuos fueron correctamente reclasificados por medio de las funciones discriminantes (Tabla 51), mostrando la existencia de una marcada diferenciación bioacústica entre las tres especies.

Tabla 51: Tabla de clasificación del Análisis Discriminante basado en variables bioacústicas para distinguir las tres especies de *Pleurodema* de canto simple. El porcentaje de clasificación correcta total es 100.

Especie	n	Especie predicha		
		<i>P. tucumanum</i>	<i>P. guayapae</i>	<i>P. nebulosum</i>
<i>P. tucumanum</i>	120	120 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>P. guayapae</i>	42	0 (0%)	42 (100%)	0 (0%)
<i>P. nebulosum</i>	32	0 (0%)	0 (0%)	32 (100%)

Las pruebas de Shapiro-Wilks sobre las variables acústicas de las tres especies indicaron que únicamente se rechazó la hipótesis de distribución normal en las variables Pulsos/Canto, Duración del pulso e Intervalo entre pulsos para la especie *Pleurodema tucumanum*, aceptando la normalidad en las restantes variables (Tabla 52).

Tabla 52: Resultados del Test de normalidad de las variables acústicas para las especies de *Pleurodema* de canto simple* (*P. tucumanum*, n = 120; *P. guayapae*, n = 42; *P. nebulosum*, n = 32) y su significancia. **W** representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad ($\alpha = 0.05$).

Variables	Test de Shapiro-Wilks					
	<i>Pleurodema tucumanum</i>		<i>Pleurodema guayapae</i>		<i>Pleurodema nebulosum</i>	
	W	p	W	p	W	p
Duración del canto (DC)	0.974962	0.2330	0.961387	0.2418	0.967725	0.4995
Intervalo entre cantos (IC)	0.981781	0.5763	0.965246	0.3231	0.958988	0.3067
Pulsos/canto (P/C)	0.965085	0.0335	0.964752	0.3116	0.986262	0.9554
Frecuencia dominante (FD)	0.979686	0.4564	0.947179	0.0749	0.944028	0.1193
Duración del pulso (DP)	0.955389	0.0030	0.970260	0.4569	0.951869	0.1979
Intervalo entre pulsos (IP)	0.961660	0.0150	0.946141	0.0685	0.933673	0.0600
Tasa de pulsos (TP)	0.968466	0.0697	0.980283	0.7828	0.956887	0.2703

*Las variables acústicas temperatura-dependientes de *P. tucumanum* y *P. nebulosum* están estandarizadas con temperatura del agua de 22°C

El análisis estadístico entre las tres especies de canto simple mediante la comparación de sus medias o medianas (dependiendo de la distribución de los datos) confirmó lo observado en los análisis multivariados, indicando diferencias altamente significativas entre las tres especies en todas las variables evaluadas (Tabla 53).

Tabla 53: Estadísticos del test *t* (o *U* de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales) entre las especies de *Pleurodema* de canto simple para cada variable bioacústica. *t* y *U* representan el estadístico, *p* la probabilidad. Todas las variables resultaron significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Variables	<i>P. tucumanum</i> vs. <i>P. nebulosum</i>		<i>P. tucumanum</i> vs. <i>P. guayapae</i>		<i>P. nebulosum</i> vs. <i>P. guayapae</i>	
	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>	<i>t</i> o <i>U</i>	<i>p</i>
Duración del canto (DC)	16.8118	0.0000	8.6864	0.0000	-31.0086	0.0000
Intervalo entre cantos (IC)	10.8383	0.0000	-8.0136	0.0000	-14.8499	0.0000
Pulsos/canto (P/C)	35.0	0.0000	4054.5	0.0000	-32.1145	0.0000
Frecuencia dominante (FD)	6.1463	0.0000	100.002	0.0000	68.8948	0.0000
Duración del pulso (DP)	1048.0	0.0001	3967.0	0.0000	-14.6299	0.0000
Intervalo entre pulsos (IP)	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	5.8684	0.0000
Tasa de pulsos (TP)	-54.2785	0.0000	-53.1661	0.0000	6.5008	0.0000

Cantos compuestos

En cuanto a las especies de canto compuesto, las variables temperatura-independientes se cargaron con las medias individuales y las variables temperatura-dependientes anteriormente se estandarizaron a una temperatura del agua de 20°C según los modelos de regresión previamente obtenidos.

El Análisis de Componentes Principales con rotación Varimax para las dos especies de *Pleurodema* de canto compuesto se realizó con 10 variables bioacústicas. Se obtuvieron dos Factores con eigenvalores >1 y ellos explican el 77.8% de la variabilidad total de los datos originales (Tabla 54). El primer y segundo intervalo entre pulsos, la duración del tren de pulsos y las tasas tanto de pulsos como de trenes de pulsos son las variables de mayor importancia en el primer Factor, en tanto que la duración de los pulsos son las variables de mayor peso en el segundo Factor (Tabla 54).

En el gráfico de dispersión del primer Componente versus el segundo se puede observar la segregación de las especies en dos grupos prácticamente exclusivos (Fig. 45). Los individuos de *Pleurodema cordobae* se asocian a valores bajos del Factor 1 y 2 mientras que los individuos de *P. kriegi* se relacionan con valores altos de ambos

Factores. Estos resultados estarían indicando que *Pleurodema kriegi* se diferencia de *Pleurodema cordobae* por poseer valores mayores en las duraciones de trenes de pulsos, duraciones de pulsos e intervalos de pulsos, con sus consecuentes tasas de trenes de pulsos y tasa de pulsos menores.

Tabla 54: Eigenvectores, eigenvalores y porcentaje de varianza explicada para los dos Factores con eigenvalores >1 resultantes del Análisis de Componentes Principales, luego de la rotación varimax, para los datos de bioacústica de las dos especies de *Pleurodema* de canto compuesto (*P. kriegi* y *P. cordobae*).

Variable	Factor 1	Factor 2
Frecuencia dominante	0.6184	-0.0734
Duración del tren de pulsos	0.7539	0.6326
Intervalo entre trenes de pulsos	0.4322	-0.6324
Tasa de pulsos	-0.8665	-0.4685
Tasa de trenes de pulsos	-0.8973	0.0145
Duración del primer pulso	0.0074	0.9237
Duración del segundo pulso	0.1231	0.9064
Duración del tercer pulso	0.1732	0.7899
1° intervalo entre pulsos	0.9099	0.0887
2° intervalo entre pulsos	0.9369	-0.0142
<i>Eigenvalor</i>	4.9244	2.85246
<i>Porcentaje de varianza</i>	49.244	28.525

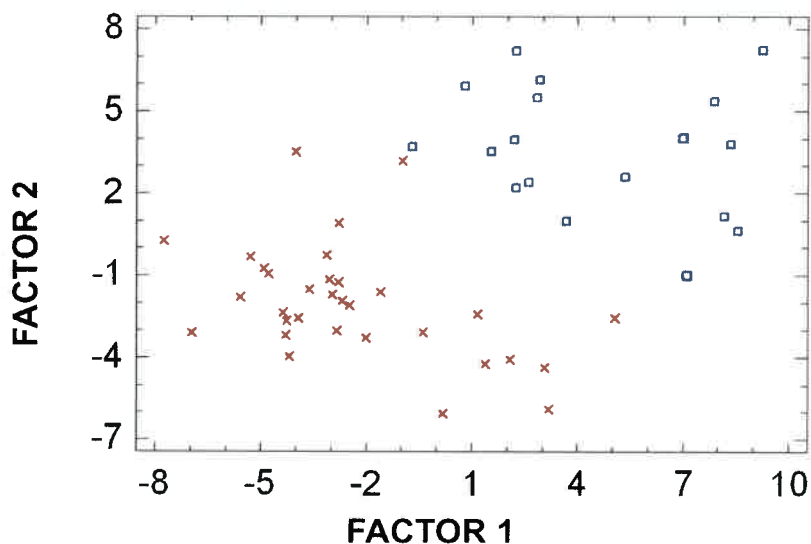


Figura 45: Diagrama de dispersión de los valores de los dos primeros Componentes Principales para *P. kriegi* (□) y *P. cordobae* (×). Los eigenvalores, eigenvectores y el porcentaje de varianza explicada por cada Componente se muestran en la Tabla 54.

El Análisis Discriminante (Tabla 55), que maximiza las diferencias entre las especies, ratifica lo observado en el Análisis de Componentes Principales. Todos los individuos fueron correctamente reclasificados por medio de la Función Discriminante (Tabla 56).

Tabla 55: Funciones Discriminantes basadas en variables bioacústicas para distinguir las dos especies de *Pleurodema* de canto compuesto.

Función Discriminante	Eigenvalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica	Lambda de Wilks	χ^2	g.l.	Significancia
1	9.6114	100	0.9517	0.0942	100.925	10	$p << 0.0001$

Tabla 56: Tabla de clasificación del Análisis Discriminante basado en variables bioacústicas para distinguir las dos especies de *Pleurodema* de canto compuesto. El porcentaje de clasificación correcta total es 100.

Especie	n	Especie predicha	
		<i>P. kriegi</i>	<i>P. cordobae</i>
<i>P. kriegi</i>	18	18 (100%)	0
<i>P. cordobae</i>	33	0	33 (100%)

Las pruebas de normalidad de los datos sobre las variables acústicas de *P. kriegi* y *Pleurodema cordobae* indicaron que únicamente se rechazó la hipótesis de distribución normal en las variables Duración del tren de pulsos para la especie *Pleurodema kriegi* e Intervalo entre trenes de pulsos en la especie *Pleurodema cordobae*, aceptando la normalidad en las restantes variables (Tabla 57).

Al igual que lo obtenido en la comparación de las especies de canto simple, las dos especies de canto compuesto muestran una diferenciación bioacústica muy notoria (Tabla 56), indicando diferencias significativas en 9 de las 10 variables evaluadas (Tabla 57).

Tabla 57: Resultados del Test de normalidad de las variables acústicas para las especies de *Pleurodema* de canto compuesto* (*P. kriegi*, n = 18; *P. cordobae*, n = 33) y su significancia.

W representa el estadístico Shapiro-Wilks, **p** la probabilidad, se destacan las variables donde se rechaza la hipótesis de normalidad.

Estadísticos del test *t* entre especies para cada variable (o *U* de Mann-Whitney en cursiva en las variables que resultaron no normales). *t* y *U* representan el estadístico, **p** la probabilidad. Se destacan las variables significativamente diferentes. ($\alpha = 0.05$).

Variables	Test de Shapiro-Wilks				Test <i>t</i> o Mann-Whitney	
	<i>Pleurodema kriegi</i>		<i>Pleurodema cordobae</i>		<i>t</i> o <i>U</i>	p
	W	p	W	p		
Frecuencia dominante (FD)	0.972984	0.8317	0.947998	0.1451	2.74419	0.0085
Duración del tren de pulsos (DTP)	0.890887	0.0396	0.977574	0.7629	0.0	0.0000
Intervalo entre trenes de pulsos (ITP)	0.939958	0.2936	0.879182	0.0013	369.0	0.1587
Tasa de pulsos (TP)	0.954502	0.4977	0.984024	0.9174	-12.584	0.0000
Tasa de trenes de pulsos (TTP)	0.94664	0.3773	0.964884	0.4167	-3.7264	0.0005
Duración del primer pulso (D1°P)	0.976106	0.8812	0.94546	0.1224	5.00236	0.0000
1° intervalo entre pulsos (D1°IP)	0.945091	0.3564	0.943689	0.1086	57.0	0.0000
Duración del segundo pulso (D2°P)	0.963452	0.6580	0.96423	0.4016	6.18085	0.0000
2° intervalo entre pulsos (D2°IP)	0.91202	0.0952	0.974857	0.6858	6.15152	0.0000
Duración del tercer pulso (D3°P)	0.920107	0.1328	0.976627	0.7364	4.155	0.0001

*Las variables acústicas temperatura-dependientes de *P. kriegi* y *Pleurodema cordobae* están estandarizadas con temperatura del agua de 20°C

Discusión

De acuerdo a los patrones temporales, los cantos de advertencia de *Pleurodema tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum* fueron definidos como cantos simples, en tanto que los cantos de *Pleurodema cordobae* y *P. kriegi* fueron definidos como cantos compuestos. Según la clasificación de los cantos realizada por Littlejohn (2001), basada en los patrones temporales de las señales acústicas, los cantos simples responderían a un único tren de pulsos periódicos (“single periodic pulse train”), en tanto que los cantos compuestos responden a cantos monofásicos constituidos por un grupo de trenes de pulsos similares (“monophasic call consisting of a group of similar pulse trains”). Los cantos de advertencia de las especies del género *Pleurodema* son conocidos para trece de sus quince especies descritas. En el caso de *Pleurodema bufoninum*, no se han registrado cantos de advertencia (Duellman & Veloso, 1977) y según Ceï (1980) es muy probablemente que no posea canto de advertencia, al igual que otras entidades no tan cercanamente relacionadas como las especies andinas del grupo *Rhinella spinulosa* (Brown & Littlejohn, 1972; Penna & Veloso, 1981; di Tada *et al.*, 2001). En lo que respecta a *P. fuscomaculatum*, su asignación al género *Pleurodema* es reciente (Nascimento *et al.*, 2006) y no hay datos reportados de su canto de advertencia (Kolenc *et al.*, 2009). Las restantes trece especies del género poseen cantos de advertencia que podrían agruparse como simples o compuestos. Dentro de las especies que poseen cantos simples pulsados se encuentran *Pleurodema tucumanum*, *P. guayapae*, *P. nebulosum*, *P. brachyops*, *P. cinereum*, *P. marmoratum* y *P. borellii* (Barrio, 1964; McLister *et al.*, 1991; Duellman & Veloso, 1977; Márquez *et al.*, 1995), en tanto que *P. kriegi*, *P. cordobae*, *P. bibroni*, *P. thaul* y *P. diplolister* poseen cantos compuestos con trenes de pulsos (Barrio, 1977; Duellman & Veloso, 1977; Penna & Veloso, 1990; Hödl, 1992; Kolenc *et al.*, 2009).

Las propiedades de los cantos de advertencia en los anfibios anuros están controladas principalmente por las contracciones musculares del tronco y de la laringe, induciendo el pasaje de aire desde los pulmones hacia los sacos vocales y atravesando el aparato laríngeo que es el lugar donde se produce el sonido (Duellman & Trueb, 1986). A su vez, estos organismos son ectotermos y por lo tanto las propiedades acústicas de sus cantos podrían verse afectadas por la temperatura en la cual se producen dichas

emisiones. Las variables acústicas que se correlacionaron con la temperatura del agua, en las cuatro especies analizadas, son aquellas variables cuyas emisiones dependen de los músculos del tronco y laríngicos (Schmidt, 1965; Martin & Gans, 1972; Schneider, 1977; Schneider, 1988; Pough *et al.*, 1992; Das Munshi & Marsh, 1996). Gerhardt (1991) y Girgenrath & Marsh (1997) han demostrado que los pulsos regularmente espaciados en los hílidos son producidos como resultado de los músculos laríngicos que abren y cierran la laringe en sincronía con los músculos del tronco (Gerhardt, 1991; Girgenrath & Marsh, 1997). A su vez, Martin (1972), Manz (1975) y Wells & Taigen (1992) demostraron que la temperatura condiciona las propiedades contráctiles de los músculos del tronco y de la laringe involucrados en la producción del canto. Este último factor podría explicar la relación positiva de la tasa de pulsos y la tasa de trenes de pulsos respecto a la temperatura, en las todas las especies analizadas. Esta variable ambiental podría estar encubriendo diferencias o similitudes en propiedades acústicas entre especies cuando sus cantos de advertencias están siendo comparados. La tasa de pulsos mostró una variabilidad atribuida a la temperatura relativamente baja en *Pleurodema nebulosum* (19%, Tabla 34), siendo mayor en *P. tucumanum* (38%, Tabla 29) y la mayor variabilidad atribuida a la temperatura se observó en las especies *P. kriegi* y *P. cordobae* con valores del 71 y 68%, respectivamente (Tablas 39 y 45). Las tasas de trenes de pulsos en las dos especies de canto compuestos también mostraron una gran variabilidad atribuida a la temperatura (65% en *P. kriegi* y 45% en *P. cordobae*).

En contraste con las variables temporales, la frecuencia dominante no presentó asociación con la temperatura en las especies de cantos compuestos, mientras que *Pleurodema tucumanum* y *P. nebulosum* mostraron una asociación con esta variable ambiental. A pesar de la significancia de la correlación entre la variable acústica y la variable ambiental, el porcentaje de variabilidad de la Frecuencia dominante atribuida a la temperatura fue baja (4 y 16% para *P. tucumanum* y *P. nebulosum*, respectivamente; Tablas 29 y 34). Varios autores han demostrado la falta de asociación entre la frecuencia dominante del canto de advertencia y la temperatura en diferentes especies de anuros, aunque estos autores establecieron una dependencia de ésta variable respecto al tamaño del individuo (e.j., Nevo & Schneider, 1976; Gerhard, 1982; Ryan, 1986; Giacoma *et al.*, 1997; Ryan, 1988; Castellano & Giacoma, 1998; Castellano *et al.*, 1999;

Castellano *et al.*, 2002; Márquez & Bosch, 2001). La frecuencia de la mayoría de los cantos de advertencia de los anuros está directamente relacionado con la frecuencia a la cual vibran las cuerdas vocales y por lo tanto depende de la tensión de las cuerdas vocales y de la masa de los cartílagos aritenoides (Duellman & Trueb, 1986; Giacoma & Castellano, 1998; Ryan & Kime, 2002) y el tamaño del cuerpo tiene una correlación positiva con el tamaño de las cuerdas vocales y los cartílagos aritenoides (Martin, 1972; Ryan 1988; McClelland *et al.* 1996). Por lo tanto, los machos de mayor tamaño generalmente tienden a producir cantos de frecuencia más grave. El diseño del muestreo acústico y de captura de ejemplares, considerando el ambiente reproductivo de las especies estudiadas, el sitio particular donde emiten los cantos de advertencia (microhábitat) y el tamaño relativamente pequeño de estos organismos, imposibilitó la asignación individual de cada canto registrado con los especímenes capturados. Por lo tanto, el análisis para evaluar el posible efecto del tamaño corporal sobre la frecuencia dominante del canto de advertencia no pudo realizarse.

Las variables acústicas de cada especie fueron caracterizadas mediante estadísticos de centralización y dispersión, previa estandarización de las variables temperatura-dependientes. Esta metodología permite evaluar y comparar las variables acústicas de individuos que emitieron sus cantos a diferentes temperatura, tal como fuera realizado por Heyer & Reid (2003) para *Leptodactylus fuscus*. Además, los valores de las variables temperatura-dependientes van acompañado por los modelos de regresión lineal obtenidos respecto a la temperatura. Estos modelos permiten inferir el valor de las variables acústicas para otra temperatura de interés y de esta manera ser útiles para comparar los resultados con los de otras investigaciones.

Los trabajos relacionados a aspectos bioacústicos de las especies del género son escasos, y en los casos que se realizan aportes sobre los mismos la información suministrada es limitada (Tablas 58 y 59). En este trabajo, el análisis de 774 cantos correspondientes a 245 individuos de las cinco especies, dentro de un rango de temperatura elevado (Tabla 27) ha permitido realizar un análisis consistente y representativo de cada especie. En lo que refiere a las especies de cantos simples, la estructura temporal de los mismos es semejante (varios pulsos separados por interpulsos), aunque la duración del canto es muy variable entre las especies del género (Tabla 58) como así también el número de pulsos por canto y la tasa de los mismo. Las

especies del género *Pleurodema* de canto simple, en cuanto a la frecuencia dominante, podrían dividirse en tres grupos: Un grupo conformado por *P. guayapae* y *P. brachyops* con una frecuencia alrededor de los 700 Hz; un grupo conformado por *P. cinereum*, *P. marmoratum* y *P. borellii* con una frecuencia alrededor de 1600 Hz; y un tercer grupo formado por *P. tucumanum* y *P. nebulosum* con una frecuencia aproximada de 2600 Hz.

El canto de advertencia de *Pleurodema tucumanum* fue estudiado por Barrio (1964) y por McLister *et al.*, (1991). Los cantos analizados por Barrio (1964) fueron registrados en la localidad de Patquía, La Rioja, a una temperatura del agua de 25.2°C, en tanto que los cantos analizados por McLister *et al.*, (1991) son de Tucumán y fueron grabados a una temperatura del agua de 20°C. A los fines comparativos, aquellas variables que en este estudio resultaron temperatura-dependiente fueron ajustadas a las temperaturas de los trabajos mencionados. De esta manera, la duración del canto sería de 289 ms a 20°C y de 263 ms a 25.2°C, en tanto que la frecuencia dominante sería de 2543 y 2589 Hz para las diferentes temperaturas, respectivamente. En lo que respecta a la duración del canto, Barrio (1964) presenta valores ligeramente mayores y no indica la cantidad de cantos e individuos analizados, en tanto que McLister *et al.*, (1991) presentan un valor notoriamente menor para tres cantos de un único individuo analizado. La frecuencia dominante enunciada tanto por Barrio (1964) como por McLister *et al.*, (1991), indica valores de aproximadamente 150Hz mayores a los contenidos en este análisis. Una posible explicación a las diferencias halladas podría ser el bajo número de cantos e individuos analizados. Los datos aportados por McLister *et al.*, (1991) provienen del análisis de tres cantos de un único individuo, en tanto que Barrio (1964) no indica la cantidad de cantos analizados. Si bien estos primeros trabajos pioneros en bioacústica permiten describir cualitativamente el canto de advertencia de esta especie, la caracterización cuantitativa de los mismos requiere de un mayor número de cantos e individuos, tal cual se realizara en el presente trabajo.

El canto de advertencia de *Pleurodema guayapae* únicamente fue estudiado por Barrio (1964) con material procedente de la localidad de Patquía, La Rioja, a una temperatura del agua de 25.2°C. Los cantos analizados en este estudio, también procedentes de la localidad de Patquía, fueron registrado en un rango de temperatura menor (21.9 – 23.8°C). La duración del canto y el intervalo entre los mismos indicado por Barrio (1964) quedan dentro del rango obtenido en este estudio (Tabla 58). Del

mismo modo, el valor de frecuencia dominante de 700-800 Hz dado por Barrio (1964) queda dentro del rango de frecuencia obtenido en este trabajo (674 – 839 Hz.).

Al igual que en *Pleurodema guayapae*, Barrio (1964) describe en forma general el canto de advertencia de *P. nebulosum*. Las emisiones acústicas fueron registradas en Guayapa, en cercanías a la localidad de Patquía, y no hay información sobre el número de cantos y de individuos considerados en el análisis. En esta especie existen diferencias muy marcadas. El canto de advertencia, ajustado a la misma temperatura que en Barrio (1964), presenta un valor de aproximadamente la mitad al declarado por Barrio (1964) y estos cantos son emitidos más distantes unos de otros (Tabla 58). La Frecuencia dominante también difiere, siendo aproximadamente 200 Hz menor en este estudio. En coincidencia con *Pleurodema tucumanum*, las diferencias halladas son difíciles de interpretar, ya que como fuera mencionado, el número de canto e individuos analizados en el trabajo de Barrio (1964) es desconocido, y probablemente exista un sesgo muestral. Hasta el presente, análisis referidos a la duración de los pulsos e interpulsos con sus respectivas tasas no han sido realizados para las especies *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum*, siendo los datos aportados en este estudio inéditos para estas especies.

En lo referente a las especies del género *Pleurodema* cuyos cantos de advertencia corresponden a cantos compuestos, se relevó información disponible para las especies *P. kriegi*, *P. bibrioni*, *P. thaul* y *P. diplolister* (Barrio, 1977, Duellman & Veloso, 1977; Penna & Veloso, 1990; Hödl, 1992; Kolenc *et al.*, 2009). En todos los casos se puede observar la elevada variabilidad en la duración de los cantos y consecuentemente alta variabilidad en el número de trenes de pulsos por canto (Tabla 59), coincidiendo con lo obtenido en este estudio para *P. kriegi* y *P. cordobae*.

La estructura temporal del canto de advertencia de *P. kriegi* y *P. cordobae* es similar, coincidiendo además con el canto de *P. bibrioni* (Barrio, 1977; Kolenc *et al.*, 2009), estando conformado por trenes de pulsos tripulsados. A diferencia de estas tres especies, *P. thaul* posee trenes de pulsos formados por 5 ó 6 pulsos (Barrio, 1977) y *P. diplolister* posee trenes de pulsos con números de pulsos variables entre 6 y 9 (análisis de los cantos de Walter Hödl disponibles en AmphibianWeb, 2010). Respecto a la frecuencia dominante, *P. kriegi*, *P. cordobae*, *P. bibrioni* y *P. thaul* poseen valores

cercanos a los 1900 Hz con superposición de los valores entre las especies (Tabla 59), en tanto que *P. diplolister* posee una frecuencia de 875 Hz (Hödl, 1992), marcadamente inferior al resto de las especies de canto compuesto.

Barrio (1977) y más recientemente Kolenc *et al.*, (2009) han aportados datos sobre el canto de advertencia de *P. kriegi*, en tanto que datos bioacústicos de *P. cordobae* solo pueden encontrarse en el trabajo de su descripción (Valetti *et al.*, 2009). La duración del tren de pulso y el intervalo entre ellos en *P. kriegi*, con su consecuente tasa de trenes de pulsos, son similares a los valores reportados por Barrio (1977) y Kolenc *et al.* (2009), considerando el rango de temperatura de los cantos con que trabajaron estos últimos autores (Tabla 59). La tasa de pulsos de *P. kriegi* en Barrio (1977) es semejante a la obtenida en este trabajo. Sin embargo, existe una marcada diferencia en los valores de la duración de los pulsos y la tasa de los mismos respecto al trabajo de Kolenc *et al.*, (2009). Estos últimos autores declaran un rango de tasa de pulsos de 28.2 a 39.7 pulsos por segundo analizando 10 cantos de 4 individuos con un rango de temperatura del agua desde 11 a 20°C. A diferencia de estos valores, la tasa de pulsos calculada según el modelo obtenido en este trabajo desde 13.2°C (mínimo valor posible según el modelo) a 20°C indican un rango superior, de 42 a 55 pulsos/seg. Probablemente estas diferencias se puedan deber al uso de diferentes métodos para el cálculo de la tasa de pulsos y no a diferencias reales de las variables acústicas, ya que tal discrepancia también se observa en la tasa de pulsos de *P. bibrioni* declarada por Kolenc *et al.*, (2009) y Barrio (1977) (ver Tabla 59).

Los cantos de las especies abordadas en este estudio responden a diferentes patrones temporales como ya fue indicado. No poder identificar que variables son comparables (es decir caracteres homólogos) entre especies con diferentes patrones de cantos (Greene, 1994; Cannatella, 2007) imposibilitó comparar las especies de cantos simples y compuestos, infiriendo desde ya una notoria diferenciación acústica entre ellas.

El análisis bioacústico realizado entre las especies de canto simple indicó una clara separación entre las especies, mostrando diferencias en todas las variables analizadas. De la misma manera que expresó Barrio (1964) cuando comparó bioacústicamente estas tres especies, la evaluación de las especies a través de

mediciones de variables del sonograma corrobora diferencias interespecíficas que ya son evidentes al oído humano. A diferencia de lo anterior es lo ocurrido con las especies de canto compuesto. *Pleurodema kriegi* y *P. cordobae* son difícilmente distinguibles al oído humano, pero el análisis bioacústico, controlando el efecto de la temperatura, permitió determinar diferencias interespecíficas y la tasa de pulsos resultó una de las variables clasificatorias.

Gerhardt (1991) definió las propiedades que caracterizan el canto de advertencia de los anuros según su patrón de variación, clasificándolas como estáticas y dinámicas. Las propiedades estáticas son aquellas que poseen baja variabilidad dentro de una serie de cantos de un individuo y aumenta cuando se comparan entre individuos de la misma población y más aún entre diferentes poblaciones. Son caracteres altamente estereotipados. En oposición, las propiedades dinámicas son aquellas cuya variación es similar entre los diferentes niveles mencionados o incluso menor entre poblaciones (Castellano & Giacoma, 1998). Giacoma & Castellano (2001) sugieren que las propiedades estáticas del canto, por tener una alta relación con aspectos morfológicos y fisiológicos de los individuos, poseen una heredabilidad mayor que las propiedades dinámicas que tienen una mayor variabilidad respecto a los factores ambientales. Por lo tanto, Giacoma & Castellano (2001) manifestaron que la información contenida en el canto de advertencia puede estar separada en las diferentes variables. Así, las propiedades estáticas podrían ser importantes en el reconocimiento de la especie, en tanto que las propiedades dinámicas pueden ser importantes en la elección de la pareja coespecífica. Varios estudios, en diferentes especies de anuros, han demostrado que las variables tasa de pulsos y frecuencia dominante se clasifican como propiedades estáticas, mientras que la duración del canto y del intercanto como propiedades dinámicas (Gerhard, 1991; 1995; Cocroft & Ryan, 1995; Castellano & Giacoma, 1998; Castellano *et al.*, 1999; Giacoma & Castellano, 2001). Entre las especies de canto simple estudiadas en este trabajo se puede ver una clara divergencia en las variables que se definieron como “estáticas”, a diferencia de las especies de canto compuesto. Como estas variables tendrían una tasa de evolución más alta (Giacoma & Castellano, 2001), la menor divergencia entre *Pleurodema kriegi* y *Pleurodema cordobae* respecto a las especies de canto simple, podría estar indicando un tiempo de separación evolutiva muy cercano entre ellas. La frecuencia dominante promedio del canto de *Pleurodema*

cordobae se encuentra a los 1772 Hz, aproximadamente 80 Hz menor a la frecuencia promedio de *Pleurodema kriegi*. Sin embargo, la variación intraespecífica de esta variable produce un amplio solapamiento en la frecuencia de las dos especies. Análisis posteriores considerando el efecto del tamaño corporal sobre la Frecuencia del canto serán necesarios para elucidar la presencia de divergencia entre las especies respecto a esta variable acústica. En cambio, la tasa de pulso fue comparada descontando el efecto de la temperatura y la diferencia entre las especies en esta variable acústica fue evidente.

Tabla 58. Parámetros del canto de advertencia de las especies de *Pleurodema* de canto simple. Media y rango entre paréntesis.

Especie	<i>P. tucumanum</i>			<i>P. guayanae</i>		<i>P. nebulosum</i>	
	Este trabajo	Barrio, 1964	McLister <i>et al.</i> , 1991 (3 cantos, 1 individuo)	Este trabajo	Barrio, 1964	Este trabajo	Barrio, 1964
Lugar		Patquía, La Rioja	Tucumán	Patquía, La Rioja	Patquía, La Rioja		Patquía, La Rioja
Temperatura (°C)		25.2 (agua)	20 (agua) 22 (aire)	21.9 - 23.8° (agua)	25.2 (agua)		25.2 (agua)
Duración del canto [ms]	263 (25.2°C) 289 (20°C)	280-330	170	186.66 (155.81 - 222.52)	200	67.581 (25.2°C)	120-140
Intervalo entre cantos [ms]	339 (25.2°C)	370-4000	—	524.01 (303.98 - 769.92)	350-400	227 (25.2°C)	130-200
Pulsos/canto [N]:	34	—	—	40.84 ± 3.41 (35 - 48)	—	16 (25.2°C)	—
Duración del pulso [ms]	2.27 (1.35 - 3.28) (22°C)	—	—	2.68 (2.24 - 3.10)	—	1.89 (25.2°C)	—
Intervalo entre pulsos [ms]	6.19 (4.65 - 8.05) (22°C)	—	—	1.78 ± 0.20 (1.46 - 2.21)	—	2.11 ± 0.28 (1.63 - 2.83)	—
Tasa de pulsos [pulsos/s]:	113.4 (20°C)	—	120.6	225.01 (199.47 - 256.34)	—	254 (25.2°C)	—
Frecuencia dominante [Hz]	2589 (25.2°C) 2543 (20°C)	2600-3200	2700	752 (674 - 839)	700-800	2472 (25.2°C)	2600-3800

Tabla 58. Continuación: Parámetros del canto de advertencia de las especies de *Pleurodema* de canto simple. Media y rango entre paréntesis.

Especie	<i>P. brachyops</i>	<i>P. cinereum</i>		<i>P. marmoratum</i>	<i>P. borellii</i>
Fuente	Duellman & Veloso, 1977 (2 individuos)	Duellman & Veloso, 1977 (9 cantos, 2 individuos)	Márquez <i>et al.</i> , 1995 (22 cantos)	Duellman & Veloso, 1977 (14 cantos, 4 individuos)	McLister <i>et al.</i> , 1991 (11 cantos, 3 individuos)
Lugar	Gorgona y Montijo, Panamá	Potosí, Bolivia	Bolivia	Cuzco y Puno, Perú	Tucumán-Catamarca
Temperatura (°C)	25-29.5 (agua)	16 (agua) 18.5 (Aire)		11.5-30 (aire)	19 (agua) 23-28 aire
Duración del canto [ms]	1000 (500-1500)	170 (140-200)	157.6 (120.8-183.4)	340 (240-480)	130-170
Intervalo entre cantos [ms]	—	—	12.5 (10-18)	—	—
Pulsos/canto [N]:	—	—	—	—	—
Duración del pulso [ms]	—	—	—	—	—
Intervalo entre pulsos [ms]	—	—	—	—	—
Tasa de pulsos [pulsos/s]:	60	59.9 (50-60)	77.5 (67.4-92.7)	70 (60-80) y 50	96.2-105.8
Frecuencia dominante [Hz]	700 (650-750)	1600	1530.2 (1292.3-1635.6)	1716 (1600-1900)	1600

Tabla 59: Parámetros del canto de advertencia de las especies de *Pleurodema* de canto compuesto. Media y rango entre paréntesis.

Especie	<i>P. kriegi</i>			<i>P. cordobae</i>
	Este trabajo (33 cantos, 18 individuos)	Barrio, 1977	Kolenc <i>et al.</i> , 2009 N= 4 (10cantos)	Este trabajo (75 cantos, 29 individuos)
Fuente	La Posta, Pampa de Achala, Córdoba	Pampa de Achala, Córdoba	Pampa de Achala, Córdoba	Sierra de Comechingones, Córdoba
Temperatura (°C)	13.2 – 21.1 (agua)	15°C (aire o agua?)	8.5-17 (aire) 11-20 (agua)	13.7 - 20.
Duración del canto [ms]	11593.9 (1628.95 – 38387.0)	—	20.49 (4.04–44.76)	9754.68 (1607.0 – 39924.0)
Intervalo entre cantos [ms]	5374.41 (1669.0 – 10091.3)	—	—	2593.26 (1062.59 – 5831.5)
Trenes de pulsos/canto [N]	142.315 (20 - 498)	—	215 (41–431)	128.45 (24 - 468)
Duración del tren de pulsos [ms]:	42.65 (39.57 – 49.23)	50.4	54 (42–62)	34.44 (31.25 – 38.33)
Intervalo entre trenes de pulsos [ms]	33.05 (27.07 – 39.69)	45.7	36 (24–51)	35.43 (28.08 – 53.21)
Tasa de pulsos [pulsos/s]:	55.08 (47.83 – 59.59)	53	31.7 (28.2–39.7)	66.88 (59.86 – 74.19)
Tasa de trenes de pulsos [trenes de pulsos/s]:	13.31 (12.05 – 14.88)	11	10.6 (9.4–13.2)	14.32 (12.16 – 16.23)
Duración del primer pulso [ms]	4.78 (3.56 – 5.86)	—	9 (7–13)	3.66 (2.30 – 5.98)
Primer intervalo entre pulsos [ms]	14.68 (12.88 – 17.51)	—	—	12.16 (9.50 – 16.01)
Duración del segundo pulso [ms]	5.44 (4.12 – 6.58)	—	10 (7–12)	4.03 (2.78 – 6.21)
Segundo intervalo entre pulsos [ms]	11.58 (9.63 – 13.69)	—	—	9.37 (6.91 – 11.54)
Duración del tercer pulso [ms]	5.22 (3.42 – 7.42)	—	11 (8–13)	4.129 (2.91 – 5.52)
Frecuencia dominante [Hz]	1846.75 (1660 – 2023)	1500-2400	1801 (1729–1877)	1771.91 (1616 – 2002)

Tabla 59. Continuación: Parámetros del canto de advertencia de las especies de *Pleurodema* de canto compuesto. Media y rango entre paréntesis.

Especie	<i>P. bibroni</i>		<i>P. thaul</i>			<i>P. diplolister</i>
Fuente	Barrio, 1977	Kolenc <i>et al.</i> , 2009 (31 cantos, 3 individuos)	Barrio 1977	Duellman & Veloso, 1977 (53 cantos, 25 individuos)	Penna & Veloso, 1990 (17 individuos)	Hödl 1992 (8 cantos)
Lugar	Sgo Vásquez, Uruguay	Rocha, Uruguay	Viña del Mar, Chile	13 localidades diferentes, Chile	La Dehesa, Chile	
Temperatura (°C)	20 (aire o agua?)	6-14 (aire) 12-16 (agua)	19.5 (aire o agua?)	13-19 (aire)	5-20 (aire)	27.5 (aire) 26.5 (agua)
Duración del canto [ms]	—	18670 (1590-67820)	—	2540 (200-9000)	3280 (800-8000)	11400 (3000-33000)
Intervalo entre cantos [ms]	—	—	—	—	—	—
Trenes de pulsos/canto [N]	—	188 (17-649)	—	—	30.8 (5-64)	—
Duración del tren de pulsos [ms]:	37.7	49 (44-58)	31.4	—	55 (30-100)	61 (52-82)
Intervalo entre trenes de pulsos [ms]	69.9	48 (41-58)	33.1	—	—	—
Tasa de pulsos [pulsos/s]:	70	31.3 (26.7-35.3)	90	—	—	—
Tasa de trenes de pulsos [trenes de pulsos/s]:	10	10.4 (8.9-11.8)	16	—	9.7 (5.7-15.2)	—
Frecuencia dominante [Hz]	1500-2400	1960 (1816-2162)	1800-2300	2047 (1500-2300)	2100 (1670-2380)	875 832-912

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Dentro del continente americano, el género *Pleurodema* tiene una amplia distribución geográfica, desde su punto más septentrional en Panamá hasta la Patagonia Argentina en el sur del continente (Barrio 1964; Lynch 1971; Duellman & Veloso, 1977; Ceí, 1980; Ferraro & Casagrande, 2009; Frost, 2011; Valetti *et al.*, 2009), con quince especies habitando diferentes ecorregiones de Sudamérica. En el área central de Argentina se pudo confirmar la presencia de cinco especies. *Pleurodema tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum* fueron halladas en condición de sintopía en cuerpos de agua próximos a la localidad de Patquía, provincia de La Rioja, situación ya mencionada por Barrio (1964). Además, *P. tucumanum* fue registrada en varias localidades de la franja Occidental de la provincia de Córdoba y en Ischigualasto en la Provincia de San Juan. En esta última localidad y en la localidad de Sampacho, Suroeste de la provincia de Córdoba, la presencia de *P. tucumanum* fue registrada en sintopía con *P. nebulosum*. La presencia de *P. nebulosum* en la región suroeste de la provincia de Córdoba fue citada por Ceí y Roig (1964), pero posterior a su cita no fue hallada hasta el presente estudio, confirmando así luego de 47 años la presencia de *P. nebulosum* para dicha área.

En la Sierra Grande de Córdoba se encuentran presentes las especies *P. kriegi*, en Pampa de Achala, y *P. cordobae* en el área norte de la Sierra de Comechingones. Originalmente *Pleurodema kriegi* fue descrita por Müller en 1926 como *Paludicola kriegi* y Parker, un año posterior, la incluye dentro del género *Pleurodema* pero como posible sinonimia de *P. cinereum* y en posteriores trabajos (Freiberg, 1942; Ceí, 1956) se mantiene este criterio. Recién Gallardo (1968), luego de 48 años sin ser reencontrada, trabaja con nuevo material procedente de Pampa de Achala, y concluye que se trata de *P. bibroni*, al asemejarlas con las poblaciones uruguayas (en ese momento consideradas *P. darwini*). Recién en 1970, en un estudio citogenético del género *Pleurodema* realizado por Barrio & Rinaldi de Chieri (1970), se reconoce a esta entidad de Córdoba como especie diferente de aquella uruguaya. Laurent (1975), basándose en mediciones biométricas y de coloración, distingue las dos *taxa* y las coloca como dos especies diferentes, denominando a las poblaciones de Córdoba *P. kriegi*. Las poblaciones de *P. kriegi* siempre fueron registradas en la Pampa de Achala, a una altitud superior a los 2000 m snm (Barrio, 1977). En 1994, Ávila y Priotto, citan la presencia de dicha

especie en el cerro de Oro, 100 kilómetros hacia el sur del cerro Champaquí (Cita más austral hasta el momento), siendo el primer registro fuera de Pampa de Achala. Como resultado del presente trabajo de tesis se hallaron poblaciones de *Pleurodema aff. kriegi* en la zona norte de la Sierra de Comechingones, una formación orográfica de la Sierra Grande de Córdoba. El análisis citogenético permitió determinar que los individuos de las poblaciones de *Pleurodema aff. kriegi* provenientes de la Sierra de Comechingones poseían un complemento cromosómico octoploide, de modo tal que se trataba de una especie diferente a *P. kriegi* que es tetraploide. Sin embargo, al no conocerse el nivel de ploidía de *P. kriegi* al momento de su descripción y al ser este el único carácter que permitía la identificación y separación de estas dos especies, se debe recurrir a la comparación con el holotipo para confirmar si *P. kriegi* es tetraploide y se debe nominar como nueva especie a las poblaciones de la Sierra de Comechingones o de ser octoploide el material tipo, la nueva nominación debe aplicarse a las poblaciones tetraploides. Como hasta el momento no se habían hallado poblaciones en simpatria, la localidad tipo de *P. kriegi* podría resolver la cuestión anteriormente planteada. Sin embargo, Müller (1926), en la descripción de esta especie, declara como localidad tipo “el pié de las Sierra Grande” (*sic* Fuß der Sierra Grande von Cordoba), siendo muy amplia su descripción y pudiendo abarcar tanto las poblaciones tetraploides como octoploides. En definitiva, el único camino a seguir es la comparación con el holotipo. El holotipo fue originalmente depositado en la colección zoológica del museo de Múnich (ZSM 138/1925) y actualmente se encuentra “perdido”, quizás destruido durante la segunda guerra mundial (Glaw & Franzen, 2006). Por lo tanto, de acuerdo al artículo 75 del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 1999), fue necesario realizar una redescipción de *P. kriegi* y asignar un neotipo para resolver el problema nomenclatural entre las dos especies de *Pleurodema* en cuestión. Debido a que la mayoría de los trabajos sobre *P. kriegi* (e.j. Gallardo 1968; Barrio & Rinaldi de Chieri 1970; Laurent 1975, Barrio 1977) fueron realizados con material procedente de Pampa de Achala, incluido el trabajo donde se describe el nivel de ploidía de estas poblaciones (Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970), se seleccionaron individuos precedentes de La Posta para realizar la redescipción y asignación del neotipo a *P. kriegi* y posterior comparación con los individuos de la Sierra de Comechingones para describir la nueva especie, *Pleurodema cordobae* (Valetti, *et al.*, 2009, Anexo).

En el presente trabajo se analizaron comparativamente cinco especies de *Pleurodema* presentes en el área central de Argentina a nivel de citogenética, eritrometría, morfometría y bioacústica. El estudio citogenético, que permitió determinar la presencia de tres niveles de ploidía entre las especies analizadas, resultó ser un factor clave en la descripción de una nueva especie para el género, *Pleurodema cordobae* (Valetti *et al.*, 2009). La poliploidía es una fuerza evolutiva muy importante en algunos grupos de plantas (White, 1973; Otto & Whitton, 2000) y a pesar de que este mecanismo es menos frecuente en vertebrados (Orr, 1990; Holloway *et al.*, 2006), la poliploidía ya ha sido citada en numerosas familias de anfibios anuros. Actualmente, el género *Pleurodema* posee especies vivientes en tres niveles de ploidía y con la reciente descripción de *P. cordobae* se agrega una nueva especie poliploide en los anfibios anuros a los ya existentes (Bogart, 1980; Kawamura, 1984; Beçak & Beçak, 1998; Otto & Whitton, 2000; Martino & Sinsch, 2002; Stöck *et al.*, 2002; Rosset *et al.*, 2006).

En el grupo de las *Pleurodema* sin glándulas del área central de Argentina, es decir, *P. guayapae*, *P. nebulosum* y *P. tucumanum*, a pesar de que poseen algunos caracteres morfológicos que permiten una distinción e identificación clara, existe una similitud morfológica que llevó a considerarlas “crípticas” (Barrio, 1964). Sin embargo, y al igual que expuso Barrio (1964) al analizar las poblaciones simpátricas de estas tres entidades, el canto de advertencia que emite cada especie es muy particular, revelando mediante los análisis estadísticos que las diferencias bioacústicas permiten la segregación de las tres especies. En el caso de *Pleurodema kriegi* y *Pleurodema cordobae*, las diferencias morfológicas encontradas no permitieron una identificación inequívoca de las especies, resultando de este modo morfológicamente crípticas. Nuevamente la bioacústica permite una distinción entre ellas, aunque tal apreciación no puede hacerse auditivamente como en el caso de *P. tucumanum*, *P. guayapae* y *P. nebulosum*, similarmente a como ocurre en otros complejos de especies crípticas (e.j. *Hyla crhysoscelis* (2x)/*H. versicolor* (4x) (Holloway *et al.*, 2006); complejo *Bufo viridis* 2x/4x (Stöck, 1998); *Odontophrynus cordobae* (2x)/*O. americanus* (4x) (Martino & Sinsch, 2002). Por lo tanto, las especies carentes de glándulas son fácilmente identificadas a través de la bioacústica y morfológicamente también, en tanto que las especies que poseen glándulas solo pueden ser identificadas inequívocamente mediante el diferente nivel de ploidía presentes entre ellas, es decir, mediante análisis citogenético

o indirectamente mediante eritrometría. Si bien muchos autores consideran los términos “especies gemelas” y “especies crípticas” como sinónimos, la diferencia radica en que el término gemelas implica no solo una similitud morfológica sino que también filogenética (Knowlton, 1986). Es decir, dos especies gemelas serían dos especies hermanas crípticas. La falta de estudios filogenéticos en el género *Pleurodema* nos limita a tratar a *P. kriegi* y *P. cordobae* como especies crípticas, aunque sería muy posible que se trate de especies gemelas.

Hay casos bien estudiados de complejos de especies con diferentes niveles de ploidía que difieren en la tasa de pulsos al igual que *P. kriegi* y *P. cordobae* — e.j. *Hyla crhysoscelis* (2x)/*H. versicolor* (4x) (Holloway *et al.*, 2006); complejo *Bufo viridis* 2x/4x (Stöck, 1998); *Odontophrynus cordobae* (2x)/*O. americanus* (4x) (Martino & Sinsch, 2002) —. Sin embargo, en el complejo *Pleurodema* la especie de mayor ploidía resultó tener la tasa de pulso más alta, a diferencia de los demás complejos de especies donde la entidad de mayor ploidía posee la tasa más baja. *Pleurodema kriegi*, siendo la especie de menor ploidía, mostró un tamaño corporal menor que *P. cordobae*, en tanto que en los complejos de especies estudiados por Stöck (1998), Martino & Sinsch (2002) y Holloway *et al.*, (2006), la especie de menor ploidía se corresponde con un tamaño mayor. De esta manera, la especie de mayor tamaño posee la tasa de pulsos más alta en todos los complejos estudiados. Si bien, como ya fue discutido en el capítulo 3, el tamaño corporal de los anuros suele afectar la frecuencia del canto de advertencia, el efecto sobre las variables temporales del canto es escaso o nulo. Hasta el momento no hay una explicación posible sobre los resultados contrarios a los obtenidos por otros autores en complejos de especies con diferentes niveles de ploidía. Estudios morfométricos para analizar la variabilidad morfométrica a nivel intraespecífico asociados con datos de osteocronología permitirían conocer la edad de los individuos reproductivos en las diferentes poblaciones de *P. kriegi* y *P. cordobae*. De esta manera se podría indagar si el mayor tamaño corporal de los individuos de *P. cordobae* se debe a una mayor edad de los mismo o si realmente los individuos de esta especie son de mayor tamaño que su especie críptica para una misma edad.

Al realizar estudios comparativos entre especies filogenéticamente cercanas, puede ocurrir que algunos caracteres no difieran entre tales especies. Además, los cambios evolutivos en las poblaciones no siempre responden igual para los diferentes

caracteres presentes. El trabajo de Meegaskumbura *et al.*, (2002) llevado a cabo en Sri Lanka mediante la utilización de datos morfológicos, ecológicos, bioacústicos y genéticos en sus análisis permitió incrementar el número de especies de anuros de la subfamilia Rhacophorinae de 18 a más de 100. La hipótesis de trabajo en el presente estudio se basó en el concepto de caracteres independientes, prediciendo que el uso de conjuntos de caracteres independientes permitiría identificar las diferentes especies en estudio cuando en un conjunto de caracteres único no sea posible la diferenciación e identificación de tales especies. Los resultados obtenidos indican que efectivamente la morfometría, la bioacústica y la citogenética entre las especies estudiadas muestran diferentes grados de variabilidad y el uso conjunto de las mismas permite caracterizar e identificar inequívocamente las especies de *Pleurodema* en estudio. Tal es así, que el hallazgo y descripción de *Pleurodema cordobae* bajo este estudio no podría haber sido llevado a cabo sin el análisis integrado de varios caracteres independientes, ya que esta especie es críptica con *P. kriegi*.

Dentro del género hay nueve especies que poseen glándulas lumbares y seis especies que carecen de éstas (Ceï, 1980; Duellman & Veloso, 1977; Nascimento *et al.*, 2006; Valetti *et al.*, 2009; Maciel & Nunez, 2010). Duellman & Veloso (1977) propusieron que las especies de *Pleurodema* que poseen glándulas y aquellas que carecen de las mismas forman dos grupos evolutivos separados. Las diferencias encontradas en morfometría, bioacústica y nivel de ploidía entre las especies analizadas aquí demuestran una notable separación de estos dos grupos. Sin embargo, hay especies con glándulas que poseen cantos simples (*P. borellii* y *P. cinereum*; McLister *et al.*, 1991) e inclusive *P. bufoninum* no emite cantos de advertencia (Duellman & Veloso 1977). Además, los modos reproductivos dentro del género son muy variados. Las poblaciones chilenas australes de *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum* depositan sus huevos en cordones dentro del agua (Duellman & Veloso, 1977; Ceï, 1980; Weigandt *et al.*, 2004) y este tipo de puesta se asocia con un amplexo inguinal (Hödl, 1992). *Pleurodema thaul* del centro y norte de Chile, *P. marmoratum*, *P. bibroni*, *P. kriegi* y *P. cordobae* depositan sus huevos en masas gelatinosas semisumergidas (Duellman & Veloso, 1977; Barrio, 1977; Ceï, 1980; Valetti *et al.*, 2009) mientras que el resto de las especies conocidas del género depositan sus huevos en nidos de espuma (Barrio, 1964; Duellman & Veloso 1977; Ceï, 1980; Hödl, 1992). Un estudio filogenético, aún no

realizado en este género, permitirá corroborar esta hipótesis de parentesco y evaluar los cambios en los diferentes caracteres mencionados.

Del mismo modo en que no está claro el origen de *Pleurodema kriegi* y *P. bibrioni*, a pesar de que la hipótesis más aceptada propuesta por Barrio & Rinaldi de Chieri (1970) es el origen alopoliploide del ancestro de ambas y posterior especiación por vicarianza, tampoco hay información suficiente para interpretar el origen de *P. cordobae*. Dentro del género hay tres especies poliploides, *P. cordobae* octoploide y *P. kriegi* y *P. bibrioni* tetraploides, las restantes especies conocidas son diploides. Bajo la hipótesis de un origen autopoliploide de *P. cordobae* a partir de poblaciones de *P. kriegi*, debido a su cercanía geográfica, se debería esperar que en la diacinesis se apareen los cromosomas formando tétradas, ya que en la especie de origen los cromosomas se aparean formando díadas (Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970). Esta hipótesis no sería muy adecuada bajo la suposición realizada ya que el comportamiento de los cromosomas no es el indicado. Barrio (1977) plantea que la especie antecesora de *P. kriegi* y *P. bibrioni* se habría originado por aloploidía a partir de *P. thaul* y otra especie afín (quizás extinta) en el oeste semidesértico argentino y posteriormente se habría extendido hacia el este desde las pampas hasta la costa atlántica. Finalmente, por eventos del Pleistoceno, esta especie habría quedado separada dando origen a las especies actuales *P. kriegi* en el área central de Argentina y *P. bibrioni* en Uruguay. Por lo tanto, aceptando lo expresado por Barrio (1977), el origen de *P. cordobae* según la hipótesis planteada anteriormente debería ser posterior al Pleistoceno y las diferencias genéticas entre estas dos especies serían relativamente bajas. Otra hipótesis sobre el origen de *P. cordobae* sería que antes de la separación de *P. kriegi* y *P. bibrioni*, a través de un proceso de poliploidización de este ancestro tetraploide, se haya originado esta especie octoploide. De esta manera, la especie tiene una larga historia evolutiva como octoploide y son posibles nuevos arreglos de material genético llegando a una falta de homología completa entre los cromosomas (Bogart & Wasserman, 1972), pudiendo de esta manera explicar la falta de asociación de los cromosomas en tétradas en la diacinesis. Una tercera hipótesis posible podría ser que el primer taxón presente fuera *P. cordobae* u otra especie afín pero octoploide y a partir de diploidización se originó el ancestro tetraploide que posteriormente diera origen a *P. kriegi* y *P. bibrioni*. Para hacer prevalecer alguna de estas tres hipótesis será necesario, por un lado, realizar estudios

moleculares para determinar el grado de diferenciación genética entre las tres especies (incluir a *P. bibrioni*) y por otro lado, mediante el empleo de técnicas de datación molecular estimar el tiempo de divergencia entre los taxones de este género. Estos estudios estarían arrojando información fundamental para comprender la relación entre estas tres especies. Estudios citogenéticos mediante la técnica GISH en células de *P. cordobae*, hibridada con sonda de ADN genómico total de *P. kriegi*, permitirían determinar el número de complementos cromosómicos que comparten las dos especies, pudiendo indagar mediante este procedimiento la hipótesis de origen por autoploidia de *P. kriegi*.

La descripción de *P. cordobae* es relativamente reciente (Valetti *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a que esta especie es críptica con *P. kriegi*, podría ser probable que individuos de esta especie hayan sido estudiados anteriormente pero asignados taxonómicamente como *P. kriegi*. A excepción del trabajo de Barrio & Rinaldi de Chieri (1970), los estudios realizados con material procedente de las Sierras de Córdoba no fueron analizados citogenéticamente, por lo que la asignación específica de estos individuos de *Pleurodema cf. kriegi* pasaría a quedar en condición dudosa hasta no confirmar su nivel de ploidía o realizar estudios de análisis de ADN que permitan corroborar a que especie de *Pleurodema* pertenecen. Una técnica indirecta que podría estar solucionando este tema es la eritrometría sobre los especímenes depositados en los diferentes museos de Argentina. Un estudio similar fue realizado por Rosset *et al.* (2006) para determinar la distribución geográfica de dos especies crípticas del género *Odontophrynus* con diferentes niveles de ploidía, *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus*. Por lo tanto, si bien Barrio (1977) establece un mapa de distribución de *P. kriegi* donde taxativamente considera que "... lo poco que resta aún por indagar con mayor detenimiento no modificará, a ciencia cierta, esta apreciación ni permitirá ampliar significativamente su distribución...", la presencia de una nueva especie críptica hace replantear la distribución geográfica tanto de *P. kriegi* como de *P. cordobae*. Esta última especie solo es conocida hasta el momento para su localidad típica y poblaciones cercanas. Un muestreo intensivo en el área comprendida por la Sierra de Comechingones y la Sierra de Achala, sumado al ya mencionado estudio de eritrometría, permitiría determinar la distribución geográfica de estas dos especies

críticas e indagar sobre la posible condición de simpatria en el extremo norte de distribución de *P. cordobae* y el extremo sur de distribución de *P. kriegi*.

Los análisis comparativos realizados entre *P. kriegi* y *P. cordobae* a nivel morfométrico y bioacústico indicaron diferencias significativas. En cuanto a la morfometría, 11 variables morfométricas de un total de 17 analizadas mostraron diferencias pero con un importante solapamiento de los datos. Así mismo, los datos bioacústicos mostraron un comportamiento similar, con todas las variables temporales significativamente diferentes, pero con alta variabilidad de las mismas, en tanto que la frecuencia dominante entre las dos especies no mostró diferencias significativas. A pesar de ello, la identificación inequívoca en base a estos atributos no fue posible como consecuencia del alto grado de solapamientos de los datos entre las especies. En este estudio solo se compararon las especies de dos poblaciones, desconociendo la variabilidad propia de la especie. Por lo tanto, al no haber estudios comparativos entre estas dos especies a nivel de variabilidad intra e interespecífica y debido a que las entidades de mayor ploidía podrían mostrar un mayor potencial de variabilidad genética como consecuencia de su copia genómica extra (ej. Soltis & Soltis, 2000; Beçak & Kobashi, 2004), es esperado que estas especies manifiesten un mayor potencial adaptativo, lo que se reflejaría en una mayor variabilidad morfológica y bioacústica. Por lo tanto, será de suma importancia abordar un estudio comparativo entre las especies *Pleurodema kriegi* y *P. cordobae* evaluando la variabilidad morfométrica y bioacústica a nivel intra e interespecífico.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves dos Santos, J.W.; Damasceno, R.P & da Rocha, L.B. 2003. Feeding habits of the frog *Pleurodema diplolistris* (Anura, Leptodactylidae) in Quaternary sand dunes of the Middle Rio São Francisco, Bahia, Brazil. *Phyllomedusa*. 2 (2): 83–92.
- AmphibiaWeb, 2010. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [aplicación web]. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponible en: <http://amphibiaweb.org/>. (Acceso: 25 de Agosto de 2010).
- Angulo, A. & Reichle, S. 2008. Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 152: 59–77.
- Arntzen, P. & Bauer, A.M. 1996. Species and species concepts - too many or too few? *Amphibia-Reptilia*. 17: 321–323.
- Arturi, M. 2006. Situación Ambiental en la Ecoregión Espinal. En: Brown, AD; U Martínez Ortiz; M Acerbi & J Corcuera (eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina. 587 pp.
- Aun, L. & Martori, R. 1999. Geographic distribution. *Pleurodema nebulosa*. *Herpetological Review*. 30(4): 231.
- Avila, L.J. & Priotto, J.W. 1995. "Geographic Distribution of *Pleurodema kriegi*." *Herpetological Review*. 26(2): 106.
- Baldo, J. & Gutierrez, M. 1997. "Sobre la presencia del género *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae) En el noroeste de la provincia de Córdoba con especial referencia a *Pleurodema nebulosa*." *Cuadernos de Herpetología*. 11(1–2): 71–74.
- Barrio, A. & Rinaldi de Chieri, P. 1970. Estudios citogenéticos sobre el género *Pleurodema* y sus consecuencias evolutivas (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*. 30(80): 309–319.
- Barrio, A. 1964. Especies crípticas del género *Pleurodema* que conviven en una misma área, identificadas por el canto nupcial (Anura, Leptodactylidae). *Physis*. 24(68): 471–489.
- Barrio, A. 1966. Divergencia acústica entre el canto nupcial de *Leptodactylus ocellatus* (Linne) y *L. chaquensis* Cei (Anura: Leptodactylidae). *Physis*. 26:275–277.
- Barrio, A. 1977. Aportes para la elucidación del "status" taxonómico de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *Pleurodema kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*. 37(93): 311–331.
- Basso, N.G. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. Monografía N° 1. *Asociación Herpetológica Argentina*. pp 1–70.
- Beçak, M.L. & Beçak, W. 1998. Evolution by polyploidy in Amphibia: New insights. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 80: 28–33.
- Beçak, M.L. & Kobashi, L.S. 2004. Evolution by polyploidy and gene regulation in Anura. *Genetics and Molecular Research*. 3: 195–212.
- Beçak, M.L.; Beçak, W. & Rabello, M.N. 1966. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma*. 19: 188–193.
- Beçak, M.L.; Beçak, W. & Rabello, M.N. 1967. Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae). I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma*. 22: 192–201.
- Beçak, M.L.; Denaro, L. & Beçak, W. 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics*. 9: 225–238.
- Beebee, J.C. & Griffiths, R.A. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology?. *Biological Conservation*. 125 (3): 271–285.
- Beheregaray, L.B. & Cacconet, A. 2007. Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology*. 6 (9):1–5.
- 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.; Winke, K.; Ingram, K.K. & Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 22:148–155.
- Blair, W.F. 1958. Mating Call in the Speciation of Anuran Amphibians. *The American Naturalist*. Vol. XCII, No. 862.
- Blair, W.F. 1964. Isolating mechanisms and interspecies interactions in anuran amphibians. *The Quarterly Review of Biology*. 39 (4): 334–344.
- Bogart, J.P. 1980. Evolutionary significance of polyploidy in amphibians and reptiles. *En: Lewis, W (Ed), Polyploidy: biological relevance*. Plenum Press, New York, pp. 341–378.
- Bogart, J.P. & Wasserman, A.O. 1972. Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics*. 11: 7–24.
- Bogert, C. M. 1960. The influence of sound on the behavior of amphibians and reptiles, *En W. E. Lanyon and W. N. Tavolga, Animal Sounds and Communication.*, Amer. Inst. Biol. Sci. Publ. Washington, D.C. pp 137–320.
- Bragg, A.N. 1945. The spadefoot toads of Oklahoma with a summary of our knowledge of the group. *The American Naturalist*. 79: 52–72.
- Braun, C.A.S. 1973. Sobre a ocorrência de *Pleurodema bibrionii* Tschuidi 1928 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia.*, Zool. 44: 28–31.
- Bridarolli, M.E. & di Tada, E.I. 1994. Biogeografía de los Anfibios Anuros de la Región Central de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*. 8(1): 63–82.
- Brown, L.E. & Littlejohn, M.J. 1972. Male release call in the *Bufo americanus* group, p. 310–323. *En: Evolution in the genus Bufo*. WF Blair (ed.). Univ. of Texas Press, Austin.
- Brum-Zorrilla, N. & Sáez, F.A. 1968. Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia Anura). *Experientia*. 24: 969.
- Burkart, R.; Bárbaro, N.O.; Sánchez, R.O. & Gómez, D.A. 1999. Eco-regiones de la Argentina. Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, 42 pp.
- Burmeister, H. 1861. Reise durch die La Plata-Staaten, mit besonderer rücksicht auf die physische beschaffenheit und den culturzustand der Argentinischen republik. W. Schmidt, Halle, 538 pp.
- Cannatella, D.C. 2007. An Integrative Phylogeny of Amphibia. *En: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN (eds) Hearing and sound communication in amphibians*. Springer, New York, pp 12–43.
- Capitanelli, R.G. 1979. Clima. *En: Vázquez, J.B., Miatello R.A. & Roqué, M.E. (Eds.), Geografía física de la provincia de Córdoba*. Editorial Boldt, Buenos Aires, pp. 45–138.
- Carvajal Murcia, J.; Nates-Parra, G. & Burbano, C.B. 1995. Fijación carnoy, una técnica para obtención de cromosomas en Hymenoptera. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*. 3(2):15–20: 1995 15.
- Castellano, S. & Giacoma, C. 1998. Stabilizing and directional female choice for male calls in the European green toad. *Animal Behaviour*. 56(2): 275–287.
- Castellano, S.; Rosso, A.; Doglio, S. & Giacoma, C. 1999. Body size and calling variation in the green toad, *Bufo viridis*. *Journal of Zoology*. 248: 83–90.
- Castellano, S.; Cuatto, B.; Rinella, R.; Rosso, A. & Giacoma, C. 2002. The advertisement call of the European treefrogs (*Hyla arborea*): a multilevel study of variation. *Ethology*. 108:75–89.
- Cei, J.M. 1962. Batracios de Chile. Ediciones Universidad de Chile, Santiago, 128 pp.
- Cei, J.M. 1972. Segregación corológica y procesos de especiación por aislamiento en anfibios de la Pampa de Achala, Córdoba. *Acta Zoológica Lilloana*. 29: 233–246.
- Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.) Monografia 2*, 609 pp.
- Cei, J.M. 1987. Additional notes to Amphibians of Argentina: An update, 1980–1986. *Monitore Zoologico Italiano. Monografia (Nueva Serie) Firenze*. 21(3):209–272.
- Cei, J.M. 1990. On a Paraguayan sample of a long time confused species: *Physalaemus fuscumaculatus* (Steindachner, 1864) (Anura, Leptodactylidae). *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali – Torino*. 8 (1): 215–231.

- Cei, J.M. & Roig, V.G. 1964. Apuntes batracológicos de un itinerario de observaciones biológicas en las llanuras pampeanas y en el litoral. *Notas Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Corrientes (Zoología)*. 4: 1–14.
- Céspedes, J.A. 1996. *Pleurodema tucumana* (Side-spotted Toad). ARGENTINA: CHACO. *Herpetological Review*. 27(1): 30.
- Céspedes, J.A. 1997. "Geographic Distribution. *Pleurodema borelli*." *Herpetological Review*. 28(4): 208.
- Charif, R.A.; Mitchell, S. & Clarck, C.W. 1995. Canary 1.2 user's manual. Ithaca, New York: Cornell Laboratory of Ornithology, 229p.
- Cocroft, R.B. 1994. A cladistic analysis of chorus frog phylogeny (Hylidae: *Pseudacris*). *Herpetologica*. 50(4): 420–437.
- Cocroft, R.B. & Ryan, M.J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*. 49: 283–303.
- Crump, M.L. 1974. Reproductive strategies in a tropical anuran community. University of Kansas Museum of Natural History Miscellaneous Publications 61: 1–68.
- Das Munshi, M. & Marsh, R. 1996. Seasonal changes in contractile properties of the trunk muscles in *Hyla chrysoscelis*. *American Zoologist*. 36:16A.
- Davies, N.B. & Halliday, T.R. 1977. Optimal mate selection in the *Bufo bufo*. *Nature*. 269: 56–58.
- di Tada, I.E.; Zavattieri, M.V.; Bridarolli, M.E.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 1996. Anfibios Anuros de la Provincia de Córdoba, pp.: 191–213. En: I.E. di Tada y E.H. Bucher (Eds.), Biodiversidad de la Provincia de Córdoba. Fauna. Vol. I, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- di Tada, I.E.; Martino, A.L. & Sinsch, U. 2001. Release vocalizations in neotropical toads (*Bufo*): ecological constrains and phylogenetic implications. *Journal of Systematic Evolutionary Research*. 39: 13–23.
- Dobson, A.J. 1983. Introduction to Statistical Modeling. Chapman and Hall, London.
- Drewry, G.E. & Rand, A.S. 1983. Characteristics of an acoustic community: Puerto Rican frogs of the genus *Eleutherodactylus*. *Copeia*. 4: 941–953.
- Duellman, W.E. & Lescure, J. 1973. Life history and ecology of the hylid frog *Osteocephalus taurinus*, with observations on larval behavior. *Occasional papers museum of natural history*. 13: 1–12.
- Duellman, W.E. & Veloso, A. 1977. Phylogeny of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae): A biogeographic model. Occasional Papers, Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas. 64: 1–46.
- Duellman, W.E. & Pyles, R.A. 1983. Acoustic Resource Partitioning in Anuran Communities. *Copeia*. 3: 639–649.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. 1986. Biology of Amphibian. New York, McGraw Hill Book Co.
- Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Mexico.
- Endler, J.A. 1993. Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London B* 340: 215–225.
- Esteban, M.; Sánchez-Herráiz, M.J.; Barbadillo, L.J.; Castanet, J. & Márquez, R. 2002. Effects of age, size and temperature on the advertisement calls of two Spanish populations of *Pelodytes punctatus*. *Amphibia-Reptilia*. 23: 249–258.
- Ferraro, D. 2004. Geographic distribution. *Pleurodema nebulosum*. *Herpetological Review* 35(4): 405–406.
- Ferraro, D. & Casagrande, M.D. 2009. Geographic distribution of the genus *Pleurodema* in Argentina (Anura: Leiuperidae). *Zootaxa*. 2024: 33–55.

- Frost, D.R. 1985. Amphibian species of the world: a taxonomic and geographic reference. Allen Press, Inc. and The Association of Systematic Collection. Lawrence, KA.
- Frost, D.R. 2011. Amphibian Species of the World: an online referente. Version 5.5 (31 January, 2011). Disponible de <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gallardo, J.M. 1968. Sobre la validez de algunas especies Argentinas de *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). *Physis*. 28(76): 135–144.
- Gayou, D.C. 1984. Effects of temperature on the mating call of *Hyla versicolor*. *Copeia* 3: 733–738.
- Gerhardt, H.C. 1978. Temperature coupling in the vocal communication system of the gray tree frog *Hyla versicolor*. *Science*. 199: 992–994.
- Gerhardt, H.C. 1982. Sound pattern recognition in some North American treefrogs (Anura: Hylidae): implications for mate choice. *American Zoologist*. 22: 581–95.
- Gerhardt, H.C. 1991. Female mate choice in treefrogs: Statics and dynamics acoustic criteria. *Animal Behaviour*. 42: 615–635.
- Gerhardt, H.C. 1995. Phonotaxis in female frogs and toads: Execution and design of experiments. *En: Methods in Comparative Psychoacoustics* (Ed. by G. M. Klump, R. J. Dooling, R. R. Fay & W. C. Stebbins), pp. 209–220. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Gerhardt, H.C. & Davis, M.S. 1988. Variation in the coding of species identity in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution*. 42: 556–565.
- Gerhardt, H.C. & Bee, M.A. 2007. Recognition and localization of acoustic signals. *En: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN (eds) Hearing and sound communication in amphibians*. Springer, New York, pp 113–146.
- Giacoma, C. & Castellano, S. 2001. Advertisement call variation and speciation in the *Bufo viridis* complex. *En: Anuran communication*, Ryan, M.J., Ed. Washington: Smithsonian Institution Press, pp 205–219.
- Giacoma, C.; Zugolaro, C. & Beani, L. 1997. The advertisement call of the green toad (*Bufo viridis*): Variability and role in mate choice. *Herpetologica*. 53: 454–464.
- Girgenrath, M. & Marsh, R.L. 1997. In vivo performance of trunk muscles in tree frogs during calling. *The Journal of Experimental Biology*. 200(4): 3101–3108.
- Glaw, F. & Franzen, M. 2006. Type catalogue of amphibians in the Zoologische Staatssammlung München. *Spixiana*. 29(2): 153–192.
- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, B.D.; Noonan, B.P.; Schargel, W. & Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatoidea). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 299: 1–262.
- Greene, H.W. 1994. Homology and behavioral repertoires. *En: Hall BK (ed) Homology. The Hierarchical Basis of Comparative Biology*. San Diego: Academic, pp. 370–391.
- Gregory, T.R. & Mable, B.K. 2005. Polyploidy in animals. *En: Gregory, T.R. (ed.) The evolution of the genome*. Elsevier, Amsterdam, Boston, Tokyo.
- Grenat, P.R.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2009a. Erythrocyte size as diagnostic character for the identification of live cryptic *Odontophrynus americanus* and *O. cordobae* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa*. 2049: 67–68.
- Grenat, P.R.; Bionda, C.L.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2009b. Variation in erythrocyte size between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*. *Amphibia-Reptilia*. 30: 141–145.
- Guerreiro, A. & Cruz Baldoni, J. 2003. *Pleurodema guayapae* (NCN). ARGENTINA: SAN LUIS. *Herpetological Review*. 34(3): 259.
- Haddad, C.F.B. & Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*. 55: 207–217.
- Haene, E.H. 1994. *Pleurodema tucumana* (Anura: Leptodactylidae) en la provincial de San Juan, República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*. 8(2): 231.

- Hartl, D.L. & Jones E.W. 2002. The Chromosomal basis of heredity. *En: Essential genetics: a genomics perspective*. Boston. Jones and Bartlett Publishers, pp 73 – 120.
- Heyer, W.R. 1975. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contributions to Zoology*. 199: 1–55.
- Heyer, W. R. 2003. Ultraviolet-B and Amphibia. *Viewpoint BioScience*. 53(6): 540.
- 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)? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 75(1): 39–54.
- 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 pp.
- Hillis, D.M.; Moritz, C. & Mable, B.K. 1996. Molecular Systematics. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. 655 pp.
- Hödl, W. 1992. Reproductive behaviour in the neotropical foam-nesting frog *Pleurodema diplolistris* (Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia*. 13: 263–274.
- Holloway, A.K.; Cannatella, D.C.; Gerhardt, H.C. & Hillis, D.M. 2006. Polyploids with different origins and ancestors form a single sexual polyploid species. *The American Naturalist*. 167, E88–E101.
- ICZN, 1999. International Code of Zoological Nomenclature, International Trust for Zoological Nomenclature, London, 306 pp.
- Kawamura, T. 1984. Polyploidy in amphibians. *Zoological Science*. 1: 1–5.
- Knowlton, N. 1986. Cryptic and sibling species among the decapods Crustacea. *Journal of Crustacean Biology*. 6: 356–363.
- Kolenc, F.; Borteiro, C.; Baldo, D.; Ferraro, D.P. & Prigioni, C. 2009. The tadpoles of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their advertisement calls, natural history and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*. 1969: 1–35.
- Kuramoto, M. 1990. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bulletin of Fukuoka University of Education*. 39(3): 83–127.
- Lacadena, J.R. 1996. Citogenética. Editorial Complutense S.A., Madrid, 931 pp.
- Laurent, R.F. 1969. Diferencias morfológicas entre especies crípticas de los géneros *Pleurodema* y *Physalaemus*. *Acta Zoológica Lilloana*. 25: 81–96.
- Laurent, R.F. 1975. Diferencias biométricas entre dos poblaciones similares de *Pleurodema*. *Acta zoológica Lilloana*. 31: 99–106.
- Lavilla, E.O. 2001. Amenaza, Declinaciones Poblacionales y Extinciones en Anfibios Argentinos. *Cuadernos de Herpetología*. 15(1): 59 – 82.
- Lavilla, E.O. 2004. Reproducción y desarrollo en anuros argentinos. *En: Montero, R. y Autino, A.G. (eds.) Sistemática y filogenia de los vertebrados, con énfasis en la fauna Argentina*. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Publicación 1512. pp. 137–143.
- Lavilla, E.O. & Rougés, M. 1992. Reproducción y desarrollo de anuros argentinos. *Serie Divulgación. Asociación Herpetológica Argentina*. 5: 66 pp.
- Lavilla, E.O., Scrocchi, G.J. & Avila, L.J. 1992. Clave para la identificación de los Anfibios de la provincia de Córdoba (Argentina). *Serie Divulgación. Asociación Herpetológica Argentina*. 7: 18 pp.
- Littlejohn, M.J. 1965. Vocal communication in frogs. *Australian Natural History*. 15: 52–55.
- Littlejohn, M.J. 1977. Long-range acoustic communication in anurans: an integrated and evolutionary approach. *En: D. H. Taylor & S. I. Guttman (Eds.), The reproductive biology of amphibians*. New York, Plenum Press. Pp 263–294.
- Littlejohn, M.J. 2001. Patterns of Differentiation in Temporal Properties of Acoustic Signals of Anurans. *En: Ryan M.J., ed. Anuran communication*. Washington: Smithsonian Institution Press, 102–120.
- Littlejohn, M.J. & Martin, A.A. 1969. Acoustic interaction between two species of Leptodactylid frogs. *Animal Behaviour*. 17: 785–791.

- Lopez de Casenave, J. 2001. Estructura gremial y organización de un ensamble de aves del desierto del Monte. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Lourenço, L.B.; Nascimento, J.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(4): 481–489.
- Lynch, J.D. 1971. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication*. 53: 1–238.
- Mable, B.K.; Alexandrou, M.A. & Taylor, M.I. 2011. Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. *Journal of Zoology*. 284: 151–182.
- Macgregor, H.C. 1993. An Introduction to Animal Cytogenetics. Chapman and Hall, London, 238 pp.
- Maciel, D.B. & Nunes, I. 2010: A new species of four-eyed frog genus *Pleurodema* Tschudi, 1838 (Anura: Leiuperidae) from the rock meadows of Espinhaço range, Brazil. *Zootaxa*. 2640: 53–61.
- Manz, R. 1975. Die Fusionsfrequenzen der Kehlkopfmuskeln und eines Beinmuskels in Abhängigkeit von der Temperatur bei europaischen Froschlurchen (Anura). *Zoologische Jahrbücher Physiologie*. 79: 221–245.
- 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. 1995. Advertisement calls of the midwife toads *Alytes* (Amphibia, Anura, Discoglossidae) in continental Spain. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 33 (3–4): 185–192.
- Márquez, R. & Bosch, J. 2001. Communication and mating in the midwife toads *Alytes obstetricans* and *Alytes cisternasii*. Ten years of studies. *En: Anuran communication*, Ryan, M.J., Ed. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Márquez, R.; de la Riva, I. & Bosch, J. 1995. Advertisement calls of Bolivian Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Journal of Zoology*. 237: 313–336.
- Martin, W.F. 1971. Mechanics of sound production in toads of genus *Bufo*: passive element. *Journal of Experimental Zoology*. 176: 273–294.
- Martin, W.F. 1972. Evolution of vocalizations in the genus *Bufo*. *En: Evolution in the genus Bufo*. Blair, W.F., Ed., University of Texas Press, Austin.
- Martin, W.F. & Gans, C. 1972. Muscular control of vocal tract during release signalling in the toad *Bufo valliceps*. *Journal of Morphology*. 137: 1–27.
- 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.A. & Aun, L. 1995. Relevamiento de la Herpetofauna de las Sierras Pampeanas del Este de la Provincia de Córdoba (Argentina) (Registro de Taxa y Comentarios Taxonómicos). *Acta zoológicas lilloana*. 43(1): 88–97.
- Martori, R.A. & Avila, L.J. 1988. Nueva localidad para *Pleurodema nebulosa* Burmeister, 1861 (Amphibia, Anura). *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina*. 4(1): 12.
- Martori, R.A.; Aun, L. & Vignolo, P. 1994. Aportes al conocimiento de la biología y distribución de *Pleurodema tucumana* (Anura, Leptodactylidae). *Boletín de la Sociedad Herpetológica Argentina*. 10(1): 18–19.
- Matson, T.O. 1990. Erythrocyte size as a taxonomic character in the identification of Ohio *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Herpetologica*. 46: 457–462.
- Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concept: the denouement in the saga of the species problem. *En: Species: the units of biodiversity*. M.F. Claridge, H.A. Dawah, & M.R. Wilson (eds), pp 381–424 Chapman and Hall, Londres.
- Mayr, E. 1963. Animal species and evolution. Harvard University Press, Cambridge.

- McClelland, B.E.; Wilczynski, W. & Ryan, M.J. 1996: Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *Journal of Experimental Biology*. 199: 1907–1919.
- McDiarmid, R.W. 1994. Amphibian diversity and natural history: An overview. *En: Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians*. Heyer, R.W., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.A.C. & Foster, M.S. (eds). Washington, D.C.: Smithsonian Press.
- McLister, J.D.; Lougheed S.C. & Bogart, J. P. 1991. Electrophoretic and vocalization comparison among three leptodactylid frogs (*Pleurodema* spp.) from northwestern Argentina. *Canadian Journal of Zoology*. 69: 2397–2403.
- Meegaskumbura, M; Bossuyt, F.; Pethiyagoda, R.; Manamendra-Arachchi, K.; Bahir, M.; Milinkovitch, M.C. & Schneider, C.J. 2002. Sri Lanka: an amphibian hot spot. *Science*. 298: 379.
- Miró, R.C. 1999. El basamento Precámbrico-Paleozoico Inferior de las Sierras Pampeanas, Famatina, Cordillera Oriental y Puna. *En: Caminos, R. (Ed.), Geología Argentina*. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Anales 29, Buenos Aires, Argentina, pp. 133–167.
- Morescalchi, A. 1973 Amphibia. *En: Chiarelli A.B., Capanna, E. (eds). Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, London, United Kingston, pp 233–348.
- Müller, L. 1926. Neve reptilien und Batrachier der Zoologischen Sammlung des bayrischen Staate. *Zoologischer Anzeiger, Leipzig*. 65: 193–200.
- Narins, P.M.; Feng, A.S.; Yong, H. & Dalsgaard, J.C. 1998. Morphological, behavioral, and genetic divergence of sympatric morphotypes of the treefrog *Polypedates leucomystax* in peninsular Malaysia. *Herpetologica*. 54(2): 129–142.
- Nascimento, L.B.; Pimenta, B.V.S.; Cruz, C.A.G. & Caramaschi. U. 2006. Taxonomic status of *Gomphobates marmoratus* Reinhardt and Lütken, 1862 “1861” and *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *South American Journal of Herpetology*. 1(3): 166–174.
- Navas, C.A. 1996. The effect of temperature on the vocal activity of tropical anurans: A comparison of high and low-elevation species. *Journal of Herpetology*. 30: 488–495.
- Nevo, E. & Schneider, H. 1976. Mating call pattern of green toads in Israel and its ecological correlates. *Journal of Zoology (London)* 178: 133–145.
- Nöller, H.G. 1959. Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 269: 98–100.
- Orr, H.A. 1990 Why polyploidy is rarer in animals than in plants. Revisited. *The American Naturalist*. 136: 759–770.
- Otto, S.P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. 34: 401–437.
- Ovaska, K.E. & Caldbeck, J. 1997. Courtship call and vocalizations of the frog *Eleutherodactylus antillensis* and *Eleutherodactylus cochranæ* on the British Virgin Islands. *Journal of Herpetology*. 31(1): 149–155.
- Parker, H.W. 1927. A revision of the frogs of the genera *Pseudopaludicola*, *Physalaemus* and *Pleurodema*. *Annals and Magazine of Natural History*. 9: 450–478.
- Penna, M. & Veloso, A. 1990. Vocal diversity in frogs of the South American temperate forest. *Journal of Herpetology*. 24: 23–33
- Platz, J.E. & Forester, D.C. 1988. Geographic variation in mating call among the four subspecies of the chorus frog: *Pseudacris triseriata* (Wied). *Copeia*. 1062–1066.
- Poggio, L. & Naranjo, C.A. 2004. Citogenética. *En: Biotecnología y mejoramiento vegetal* Echenique, V., Rubinstein, C. & Mroginski, L.. Editorial INTA. Pp. 69–79.
- Pough, F.; Magnusson, W.; Ryan, M. J.; Wells, K. & Taigen, T. 1992. Behavioral energetics. *En: Environmental Physiology of Amphibians*, Feder, M.E & Burggren, W.W., Ed., Chicago University Press, Chicago, Illinois.

- Pukhta, V. & Blazhek, I.Y. 2004. Use of the ethyl ether of metaaminobenzoic acid (MS-222) for general anesthesia of cold-blooded animals. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 53: 356–358.
- Ramos, V.A. 1999. Rasgos estructurales del territorio Argentino. I. Evolución tectónica de la Argentina. *En: Caminos, R. (Ed.), Geología Argentina*. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Anales 29, Buenos Aires, Argentina, pp. 715–786.
- Reading, C.J. 2007. Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia*. 151: 125–131.
- Ringuelet, R.A. 1961. Rasgos fundamentales de la zoogeografía de la Argentina. *Physis*. 22 (63): 151–170.
- Rohlf, F.J. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 299–316.
- Rosset, S.D.; Baldo, D.; Lanzone, C. & Basso, N.G. 2006. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology* 40(4): 465–477.
- Ryan, M.J. 1986. Factors influencing the evolution of acoustic communication: Biological constraints. *Brain, Behavior and Evolution*. 28: 70–82.
- Ryan, M.J. 1988. Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication. *En: The evolution of the Amphibian Auditory System*. Fritzsche, B., Ryan, M.J., Wilczynsky, W., Hetherington, T.E. and Walkowiak, W., Ed., John Wiley and Sons, New York.
- Ryan, M.J. & Kime, N.M. 2002. Selection on long distance acoustic signals. *En: A.M. Simmons, A.N. Popper and R.R. Fay, Editors, Acoustic Communication*, Springer-Verlag, New York (2002), pp. 225–274.
- Sáez, F. & Cardoso, H. 1978. Citogenética básica y biología de los cromosomas (Secretaría General de la Organización de los Estados Unidos, eds.). Washington, D.C.: 3–117.
- Salas, N.E. 2004. Las especies del género *Odontophrynus* de la provincia de Córdoba, Argentina. Tesis doctoral presentada en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. 120p.
- Salas, N.E. & Martino, A.L. 2009. Patrones de configuraciones meióticas en poblaciones de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* (Anura: Cycloramphidae), en el área central de Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 19 (2): 27–32.
- Schiotz, A. 1973. Evolution of anuran mating call. Ecological aspects. *En: Vial, J. L. (ed.), Evolutionary Biology of Anurans, Contemporary Research on Major Problems*. Univ. Missouri Press, Missouri. Pp 311–327.
- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in amphibia. 1. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*. 66: 361–388.
- Schmid, M.; Haaf, T. & Schempp, W. 1985. Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma*. 91: 172–184.
- Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. & Poot, M. 1993. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 62: 42–48.
- Schmidt, R.S. 1965. Larynx control and call production in frogs. *Copeia*. 1965: 143–147.
- Schneider, H. 1977. Acoustic behaviour and physiology of vocalization in the European tree frog, *Hyla arborea* (L.). *En: The reproductive biology of amphibians*, Taylor, D.H. and Guttman, S.I., Ed., New York, Plenum Press.
- Schneider, H. 1988. Peripheral and central mechanisms of vocalization. *En: The evolution of the Amphibian Auditory System*. Fritzsche, B., Ryan, M.J., Wilczynsky, W., Hetherington, T.E. and Walkowiak, W., Ed., John Wiley and Sons, New York.
- Schneider, H. & Sinsch, U. 1992. Mating call variation in lake frogs referred to as *Rana ridibunda* Pallas, 1771. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutions Forschung*. 30: 297–315.

- Schneider, H. & Sinsch, U. 1999. Taxonomic reassessment of Middle Eastern lake frogs: Bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 57: 57–65.
- Schneider, H.; Sinsch, U. & Sofianidou, T. 1993. The water frogs of Greece: Bioacoustic evidence for a new species. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutions Forschung*. 31: 47–63.
- Schönrogge, K.; Barr, B.; Wardlaw, J.C.; Napper, E.; Gardner, M.G.; Breen, J.; Elmes, G.W. & Thomas, J.A. 2002. When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. *Biological Journal of the Linnean Society*. 75 (3): 291–300.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and Sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*. 1979 (2): 297–306.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 7051–7057.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. 1992. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Editorial Graf. América. México, 622 pp
- Stöck, M. 1998. Mating call differences between diploid and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex) in middle Asia. *Amphibia-Reptilia*. 19: 29–42.
- Stöck, M. & Grosse, W.R. 1997. Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. *Alytes*. 15(2): 72–90.
- Stöck, M.; Lamatsch, D.K.; Steinlein, C.; Epplen, J.T.; Grosse, W.R.; Hock, R.; Klapperstück, T.; Lampert, K.P.; Scheer, U.; Schmid, M. & Schartl, M. 2002. A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nature Genetics*. 30: 325–328.
- Straughan, I.R.. 1973. Evolution of anuran mating calls. Bioacustical aspects. Contemporary Research on Major Problems. Ed.J. L. Vial. Univ. Missouri Press. Cap.10.: 321–327.
- Tandy, M & Keith, R. 1972. *Bufo* of Africa. *En: Evolution in the genus Bufo*. University of Texas press. 119–170.
- Torrella, S.A & Adámoli, J. 2006. Situación ambiental de la ecorregion Chaco Seco. *En: Brown, A., Martínez Ortiz, U., Acerbi, M. & Corchera, J. (eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. (Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, pp 74–100.*
- Tymowska, J. 1991. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. *En: Green, D.M. & Session S.K. (eds) Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego: Academic press, 259–297.*
- Úbeda, C. 2001. Geographic distribution. *Pleurodema thaul*. *Herpetological Review*. 32(4): 272.
- Ursprung, E.; Ringler, M. & Hödl, W. 2008. Phonotactic approach pattern in the neotropical frog *Allobates femoralis*: A spatial and temporal analysis. *Behaviour*. 146: 153–170.
- Vaira, M. 1997. Geographic distribution. *Pleurodema tucumana*. *Herpetological Review*. 28(3): 156.
- 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.
- Valetti, J.A.; Otero, M.A.; Grenat, P.R. & Martino, A.L. 2011. Clutch size. *Pleurodema cordobae* (Octoploid *Pleurodema*). *Herpetological Review*. 42 (3): 413.
- Veloso, A.M.; Diaz, N.P. & Galleguillos, R.G. 1972. Revisión cariosistémática de las especies del género *Pleurodema* en Chile (Anura: Leptodactylidae). *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso*. 6: 49–55.
- Viglizzo, E.F.; Frank, F.C. & Carreño, L. 2006. Situación ambiental en las ecoregiones Pampa y Campos y Malezas. *En: Brown, AD; U Martínez Ortiz; M Acerbi & J Corcuera (eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina. 587 pp.*
- Villavicencio, H.J.; Cánovas, M.G & Acosta, J.C. 2007. Reproduction. *Pleurodema tucumana*. *Herpetological Review*. 38(3): 325.

- Walkowiak, W. 2007. Call production and neural basis of vocalization. *En*: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN (eds) *Hearing and sound communication in amphibians*. Springer, New York, pp 87–112.
- Watkins, W.A.; Baylor, E.R. & Bowen, A.T. 1970. The call of *Eleutherodactylus johnstonei*, the whistling frog of Bermuda. *Copeia*. 1970: 558–561.
- Weigandt, M.; Úbeda, C.A. & Díaz, M. 2004. The larva of *Pleurodema bufoninum* Bell, 1843, with comments on its biology and on the egg strings (Anura, Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia*. 25: 429–437.
- Wells, K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behaviour*. 25:666–693.
- Wells, K.D. 1978. Territoriality in the frog (*Rana clamitans*): Vocalizations and agonistic behavior. *Animal Behaviour*. 26 (4): 1051–1063.
- Wells, K.D. 1988. The effects of social interactions on anuran vocal behavior. *En*: Fritszch B, Wilczynski W, Ryan MJ, Hetherington T, Walkowiak W (eds) *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. New York: Wiley, pp. 433–454.
- Wells, K.D. & Taigen, T.L. 1992. The energetics of reproductive behaviour. *En*: *Environmental Physiology of Amphibians*, Feder, M.E and Burggren, W.W., Ed., Chicago University Press, Chicago, Illinois
- White, M.J.D. 1973. *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Pr Press, London, 961 pp.
- Wilbur, H.M. & Alford, R.A. 1985. Priority effects in experimental pond communities: responses of *Hyla* to *Bufo* and *Rana*. *Ecology*. 66: 1106–1114.
- Wilson, E.O. 1980. *Sociobiología, la nueva síntesis*. Ed. Omega, Barcelona, España 701 pp.
- Winkler, H. 1916. Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zeitschrift für Botanik*. 8: 417–531.
- Wurster, D.H. & Benirschke, K. 1970. Indian momtjac, *Muntiacus muntiac*: A Deer with a low diploid chromosome number. *Science*. 168 (3937): 1364–1366.
- Zug, G.R. 1978. Anuran locomotion –Structure and function, 2: Jumping performance of semiaquatic, terrestrial, and arboreal frogs. *Smithsonian contributions to zoology*. 276: 1–31.
- Zug, G.R.; Vitt, L.J. & Caldwell, J.P. 2001. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles (2ª ed.)*. Academic Press, San Diego. 630 pp.
- Zweifel, R.G. 1959. Effect of temperature on call of the frog *Bombina variegata*. *Copeia*. 1959 (4): 322–327

ANEXO: 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.

A new polyploid species of *Pleurodema* (Anura: Leiuperidae) from Sierra de Comechingones, Córdoba, Argentina and redescription of *Pleurodema kriegi* (Müller, 1926)

JULIÁN A. VALETTI^{1,2}, NANCY E. SALAS¹ & ADOLFO L. MARTINO^{1,3}

¹National University of Rio Cuarto, Ecology, X5804BYA Rio Cuarto (Córdoba) Argentina

²CONICET

³Corresponding author: amartino@exa.unrc.edu.ar

Abstract

We describe a new anuran species of the genus *Pleurodema* from Sierra de Comechingones, Córdoba province, Argentina and redescribe *Pleurodema kriegi* with designation of neotype. The new species has lumbar glands and according to its external morphology is cryptic with *Pleurodema kriegi*. Morphometry, bioacoustics, erythrometry and cytogenetics have allowed differentiating the new species from *Pleurodema kriegi*. The new species, *Pleurodema cordobae*, is the single species of its genus with an octoploid chromosomal complement. Its distribution is only known from type locality and two temporary ponds located 5 kilometers away from the former.

Key words: Amphibia, *Pleurodema cordobae* sp. nov., Octoploid, Bioacoustics, Morphometry, Cytogenetics, Erythrometry, Redescription, Neotype, *Pleurodema kriegi*

Resumen

Nosotros describimos una nueva especie de anfibio del género *Pleurodema* de la Sierra de Comechingones, provincia de Córdoba, Argentina y redescrivimos *Pleurodema kriegi* con la asignación de un neotipo. La nueva especie tiene glándulas lumbares y según su morfología externa es críptica con *Pleurodema kriegi*. La morfometría, la bioacústica, la eritrometría y la citogenética han permitido distinguir la nueva especie respecto de *Pleurodema kriegi*. La nueva especie, *Pleurodema cordobae*, es la única de su género con un complemento cromosómico octoploide. La distribución geográfica es solamente conocida para la localidad típica y dos charcas temporarias distantes 5 kilómetros.

Introduction

Sierra de Córdoba constitutes the eastern group of the Sierras Pampeanas System embracing Sierra Grande, Sierra Norte and Sierra Chica. Sierra Grande includes Sierra de Achala to the north and Sierra de Comechingones to the south (Miró 1999; Ramos 1999). The previous tectonic processes and the current morphology from Sierra Grande favoured the topographical isolation that has produced a remarkable endemic flora and fauna due to allopatric speciation processes (Ceï 1972). The endemic herpetofauna from Sierra Grande is represented by the anurans *Odontophrynus achalensis* di Tada, Barla, Martori & Ceï, 1984, *Rhinella achalensis* (Ceï 1972) and *Pleurodema kriegi* (Müller 1926) and the saurian *Pristidactylus achalensis* (Gallardo 1964), (di Tada *et al.* 1996; Cabrera 1996).

Although polyploidy is an important evolutionary force in some groups of plants (White 1973; Otto & Whitton 2000), this mechanism is less frequent in vertebrates (Orr 1990; Holloway *et al.* 2006). However,

polyploidy in anuran amphibians has already been documented in numerous families (Bogart 1980; Kawamura 1984; Beçak & Beçak 1998; Otto & Whitton 2000; Martino & Sinsch 2002; Stöck *et al.* 2002; Rosset *et al.* 2006). There are several well-studied cases of diplo/tetraploid cryptic species pairs where bioacoustics has allowed to distinguish different *taxa* (e.g. Wasserman 1970; Ralin 1977; Gerhardt 1978; Martino & Sinsch 2002; Holloway *et al.* 2006). The genus *Pleurodema* Tschudi is distributed from Panama throughout South America to southern Chile and southern Argentina (Frost 2008) and currently is represented by thirteen species, nine of which are present in Argentina (Lynch 1971; Heyer 1975; Frost 1985; Cei 1987; McLister *et al.* 1991, Nascimento *et al.* 2006). The ploidy level of species of the genus *Pleurodema* is $2n=2X=22$ excepting *Pleurodema kriegi* and *P. bibroni* which are $2n=4X=44$ (Brum-Zorrilla & Sáez 1968; Barrio & Rinaldi de Chieri 1970; Veloso *et al.* 1972; Duellman & Veloso 1977; Schmid *et al.* 1993; Lourenço *et al.* 2006). The erythrocyte size in amphibians is correlated with the DNA content (Stöck & Grosse 1997). Therefore, and having the caution that a higher amount of nuclear DNA does not necessarily mean a different ploidy level - as was previously reported for other species of *Pleurodema* (Schmid *et al.* 1993) -, the erythrocyte size allows estimating the ploidy level in anurans in an indirect way (Martino & Sinsch 2002; Rosset *et al.* 2006).

In February 2006, during a field trip in the north area of Sierra de Comechingones we found individuals morphologically similar to *Pleurodema kriegi*. That locality is geographically located ca. 100 km south of La Posta, Pampa de Achala, Córdoba province. We compared the population from Sierra de Comechingones with *Pleurodema kriegi* from La Posta, Pampa de Achala and we determined that the specimens recently collected correspond to an undescribed species. The holotype of *Pleurodema kriegi* is actually "lost" (Glaw & Franzen 2006), and in this case, a name-bearing type is necessary to define the nominal taxon objectively. The aim of this article is describe and name a new species of genus *Pleurodema* from Sierra de Comechingones and redescribe *Pleurodema kriegi* on the basis of specimens from Pampa de Achala with designation of neotype.

Material and methods

Collection of specimens: We collected 28 males and 1 female of the new species in Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, province of Córdoba (32°23'58.4" S, 64°55'35.1" W, approximately 2105 m elevation; Fig. 1). Specimens were collected during three field trips in the years 2006/07. Additionally, in the year 2006 we collected 15 males and 3 females of *Pleurodema kriegi* in La Posta, Pampa de Achala (31°36'46" S, 64°52'29" W, approximately 2151 m elevation; Fig. 1). Specimens were preserved in 70% ethanol and they are deposited in the herpetological collection of Museum of Miguel Lillo Foundation (FML). Specimens analyzed are listed in the Appendix.

We compared the populations from Estancia Los Tabaquillos and La Posta by means of bioacoustics, morphometry, erythrometry and cytogenetics.

Morphometry: Morphometric measurements of specimens were taken *in vivo* with digital caliper Mahr 16ES to the nearest 0.01 mm and then rounded to only one decimal to avoid pseudo precision (Hayek *et al.* 2001). All measurements were taken by one of us (JV) to avoid inter-observer differences. Sixteen standard measurements were recorded (Martino & Sinsch 2002): (1) snout-vent length (SVL); (2) maximal head width; (3) head length; (4) snout-eye distance; (5) internarinal distance; (6) interocular distance; (7) eye-narinal distance; (8) rostronarinal distance; (9) eye diameter; (10) arm length (from the elbow-joint up to the top of the third finger); (11) length of 3rd finger; (12) femur length; (13) tibia length; (14) foot length (including tarsal length); (15) length of 3rd toe, (16) length of 4th toe.

For morphometric analysis only males were used and all variables were \log_{10} -transformed, standardized and subjected to a discriminant analysis (Forward selection) to identify the minimum set of variables allowable in order to distinguish the new species from *Pleurodema kriegi*. To analyze the possible difference between *Pleurodema kriegi* and the new species in these morphometric variables, univariate analyses of variance were performed.

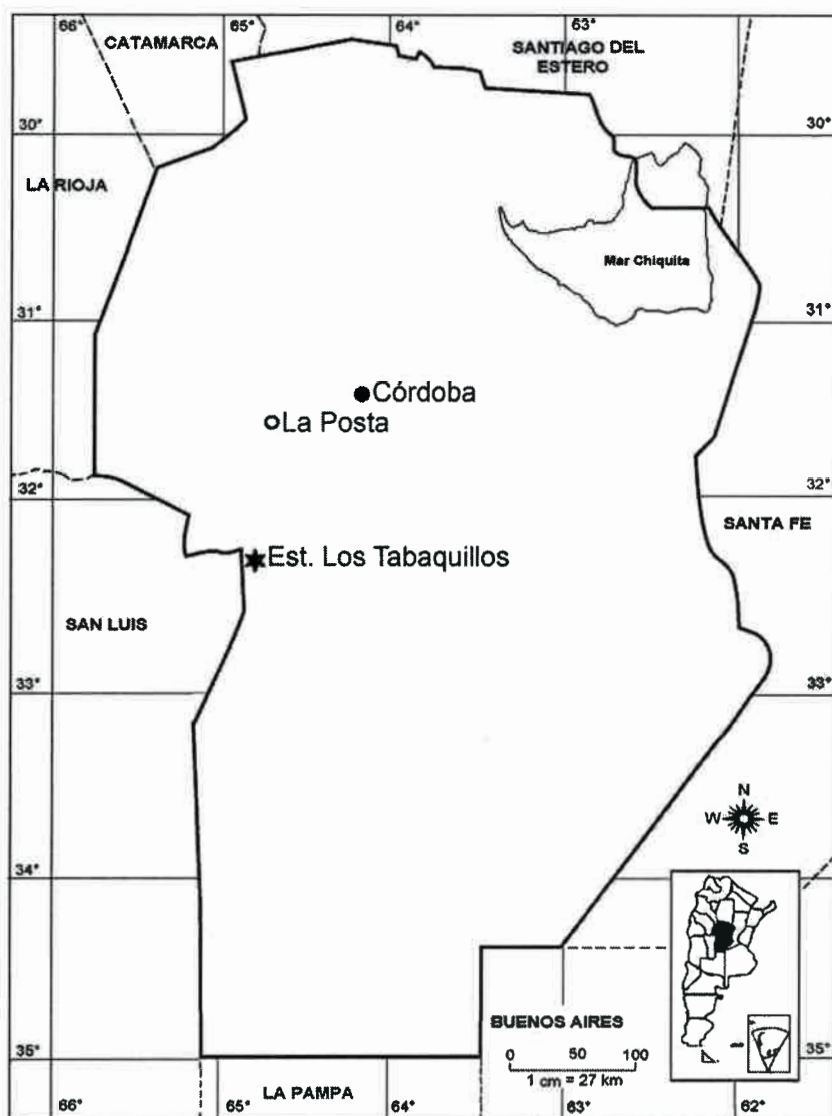


FIGURE 1. Geographic position of type locality of *Pleurodema* sp. nov. (Estancia Los Tabaquillos; asterisk) and locality of specimens of *Pleurodema kriegi* used in the redescription (La Posta, Pampa de Achala; circle).

Bioacoustics: We recorded 49 advertisement calls (22 individuals) in the population from Estancia Los Tabaquillos and 23 advertisement calls (10 individuals) from La Posta. The advertisement calls were registered using a DAT record Sony TCD-100 with stereo microphone ECM-MS907 Sony and tape TDK DAT-RGX 60. Water and air temperatures were registered immediately after each sound recording by means of a digital thermometer TES 1300 0.1°C. Water temperatures registered were between 17.5 and 20.9°C. The recordings of advertisement calls used in this study were deposited in the Fonoteca of Ecology, Department of Natural Sciences, National University of Río Cuarto, Argentina.

The advertisement calls for bioacoustic analysis were digitized using the Canary 1.2 software (Charif *et al.* 1995) at a sample rate of 44100 Hz, and sample size of 16 bits. The temporal variables of each advertisement call were measured using oscillograms and sonograms. The analyses of dominant frequency were made using a spectrogram with the following settings: filter bandwidth 649.4 Hz, frame length 256 points, grid resolution 128 points, overlap 50%, frequency 43.07 Hz, FFT size 1024 points; window function hamming; amplitude logarithmic; clipping level -95 dB. The analyzed call parameters were: (1) call duration [ms]; (2) intercall interval [ms]; (3) dominant frequency [Hz]; (4) number of pulse groups per call [N]; (5) duration of pulse group [ms]; (6) interval between pulse groups [ms]; (7) pulse duration [ms]; (8) interpulse

interval [ms]; (9) pulse rate [pulses/ sec). Three calls per series of calls, three pulse groups per call and three pulses per pulse group were analyzed. The arithmetic means of these call parameters were calculated for each series and used for further analyses (Martino & Sinsch 2002). Low temperature range of advertisement calls recorded do not allow for temperature correction using regression. To evaluate possible differences in the acoustic properties between the new species and *Pleurodema kriegi*, a discriminant analysis with all acoustic variables was performed. In order to analyze which acoustic variables differ between both *taxa*, univariate analyses of the variance were performed.

Cytogenetics: Seven specimens of the new species and three specimens of *Pleurodema kriegi* were examined. Animals were intraperitoneally injected with 0.3% colchicine (0.01 ml/g of body weight) for 10 hours. Mitotic chromosomes were obtained from testicular cell suspensions treated for 30 minutes in 1% sodium citrate (weight/volume) and then fixed in 3:1 methanol and acetic acid for 30 minutes (Schmid 1978). Chromosomes were stained with 10% Giemsa solution. Karyotypes were arranged following Levan *et al.* (1964).

Erythrometry: A blood sample of each specimen was obtained by angularis vein puncture (Nöller 1959) and blood smears were made. The largest and smallest diameter of 15 randomly chosen erythrocytes per individual were measured (to the nearest 1 μm) and surface area was calculated assuming an ellipsoid shape as $AB\pi/4$, where A and B are the largest and smallest diameter of the erythrocyte, respectively (Martino & Sinsch 2002). To compare the erythrocyte size between the new species and *Pleurodema kriegi*, univariate analysis of variance was performed.

All calculations were performed on an AMD Athlon XP 2200 PC using the program package STATGRAPHICS for Windows, version 5.0.

Results

Morphometry. Discriminant analysis showed one significant function (Canonical correlation = 0.78224; $W=0.38809$ y $p<0.0000$), which used only four out of 15 measured morphometric distances. The discriminant function is: $61.1609 - 32.1778 * \text{Log}_{10}(\text{SVL}) - 16.3516 * \text{Log}_{10}(\text{head length}) + 29.6492 * \text{Log}_{10}(\text{snout-eye distance}) - 13.2596 * \text{Log}_{10}(\text{rostronarial distance})$.

Classification matrix correctly distinguished specimens from *P. kriegi* and the new species with high values (93.33% and 96.43%, respectively). Only one individual of *P. kriegi* and one individual of the new species were incorrectly classified. The specimens of the new species are generally bigger than *P. kriegi* and ten variables were statistically different (Table 1). However, all variables present a wide overlap and none of them is diagnostic.

Bioacoustics. The advertisement call of *Pleurodema kriegi* is a compound call formed by groups or trains of pulses. All pulse trains have three pulses. The new species has the same call type. (Fig. 2 and 3). The values of the analyzed acoustic variables are shown in Table 2.

Differences in the temporal pattern of the pulse groups between species were observed. Therefore, we carried out comparisons between the two *taxa* to evaluate possible differences in the temporal variables of the pulse groups.

All temporal variables of the advertisement call in both species were statistically different (Table 2), while the dominant frequency was not significantly different. Durations of each pulse of the pulse group and its corresponding intervals also showed highly significant differences between species (Table 3).

The discriminant analysis showed a segregation of two species. The canonical correlation showed a value of 0.93252 indicating a high discriminant power of the generated function and Wilks' lambda 0.1304068 ($p < 0.0000$) indicate a high discriminant power of the variables. The most important variables in the discriminant function correspond to duration of pulse group and pulse duration (Fig. 4). The classification rate shows all cases correctly classified indicating a marked acoustic differentiation between *Pleurodema kriegi* from La Posta and the new species.

TABLE 1. Measurements in millimetres of specimens of *Pleurodema kriegi* and *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos. Mean \pm SD (Range).

Morphometric variable	<i>Pleurodema kriegi</i>	<i>Pleurodema</i> sp. nov. Estancia Los Tabaquillos
	Mean \pm SD (Range)	Mean \pm SD (Range)
Snout-vent length*	33.24 \pm 1.79 (29.37–36.80)	35.41 \pm 1.56 (32.74–38.73)
Maximal head width	13.27 \pm 0.77 (12.32–14.83)	13.29 \pm 0.68 (12.01–14.78)
Head length*	12.36 \pm 1.22 (10.48–14.30)	13.05 \pm 0.95 (10.49–14.44)
Snout-eye distance*	5.36 \pm 0.31 (4.89–5.90)	5.60 \pm 0.30 (4.97–6.10)
Internarinal distance	2.08 \pm 0.26 (1.71–2.69)	2.20 \pm 0.19 (1.95–2.64)
Interocular distance	3.05 \pm 0.22 (2.69–3.38)	2.92 \pm 0.34 (2.36–3.63)
Eye-narinal distance	2.90 \pm 0.16 (2.57–3.10)	2.80 \pm 0.24 (2.33–3.17)
Rostronarinal distance*	3.04 \pm 0.18 (2.71–3.33)	3.22 \pm 0.31 (2.82–4.22)
Eye diameter	3.55 \pm 0.30 (3.18–4.30)	3.63 \pm 0.30 (2.48–4.02)
Arm length *	15.56 \pm 0.97 (13.48–17.50)	16.31 \pm 0.92 (14.53–18.33)
Length of 3 rd finger*	4.91 \pm 0.36 (4.60–5.89)	5.27 \pm 0.40 (4.45–6.07)
Femur length	14.89 \pm 0.90 (13.48–17.00)	15.02 \pm 0.76 (13.63–16.59)
Tibia length *	15.51 \pm 0.50 (14.59–16.50)	16.09 \pm 0.92 (13.28–18.21)
Foot length*	23.16 \pm 0.46 (22.40–24.09)	24.56 \pm 1.27 (22.21–27.28)
Length of 4 th toe*	9.08 \pm 0.57 (8.30–10.60)	9.96 \pm 0.66 (8.44–11.48)
Length of 3 rd toe*	5.22 \pm 0.42 (4.45–5.90)	5.49 \pm 0.37 (4.96–6.58)

n= 15 males of *Pleurodema kriegi* and 28 males of *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos.

* statistically different variables between populations (ANOVA, p<0.05)

TABLE 2. Features of the advertisement calls. Means, standard deviations and range refer to water temperature of 17.5–20.9°C in *Pleurodema kriegi* and 18.8–19.6°C in *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos.

Call variable	<i>Pleurodema kriegi</i>		<i>Pleurodema</i> sp. nov. Estancia Los Tabaquillos	
	n	Mean \pm SD (Range)	n	Mean \pm SD (Range)
Call duration [ms] *	10/23	16338.8 \pm 11990.0 (3701.0–38387.0)	22/49	7853.83 \pm 4480.53 (1607.0–16453.3)
Intercall interval [ms] *	6/15	5925.41 \pm 3355.82 (1669.0–10091.3)	18/37	2720.38 \pm 1355.56 (1082.5–5831.5)
Dominant frequency [Hz]	10/23	1823 \pm 91 (1660–1938)	22/49	1793 \pm 100 (1616–2002)
Number of pulse groups per call [N] *	10/23	200.77 \pm 164.38 (53–498)	22/49	110.311 \pm 61.66 (24–229)
Duration of pulse group [ms] *	10/23/69	42.54 \pm 3.03 (38.88–48.13)	22/49/147	35.23 \pm 1.59 (31.07–37.31)
Interval between pulse groups [ms] *	10/23/69	30.42 \pm 2.70 (26.75–36.88)	22/49/147	35.61 \pm 4.47 (29.02–45.49)
Pulse duration [ms] *	10/23/69/ 207	5.42 \pm 0.74 (4.09–6.14)	22/49/147/441	3.89 \pm 0.49 (2.89–4.90)
Interpulse interval [ms] *	10/23/69/ 207	12.53 \pm 1.38 (10.72–14.76)	22/49/147/441	11.37 \pm 1.20 (9.25–13.62)
Pulse rate [pulses/ sec] *	10/23	55.94 \pm 3.71 (49.14–60.49)	22/49	65.69 \pm 3.74 (60.15–74.48)

n= Individuals/Calls/ Number of pulse groups per call /Pulses)

* statistically different variables between populations (ANOVA, p<0.05).

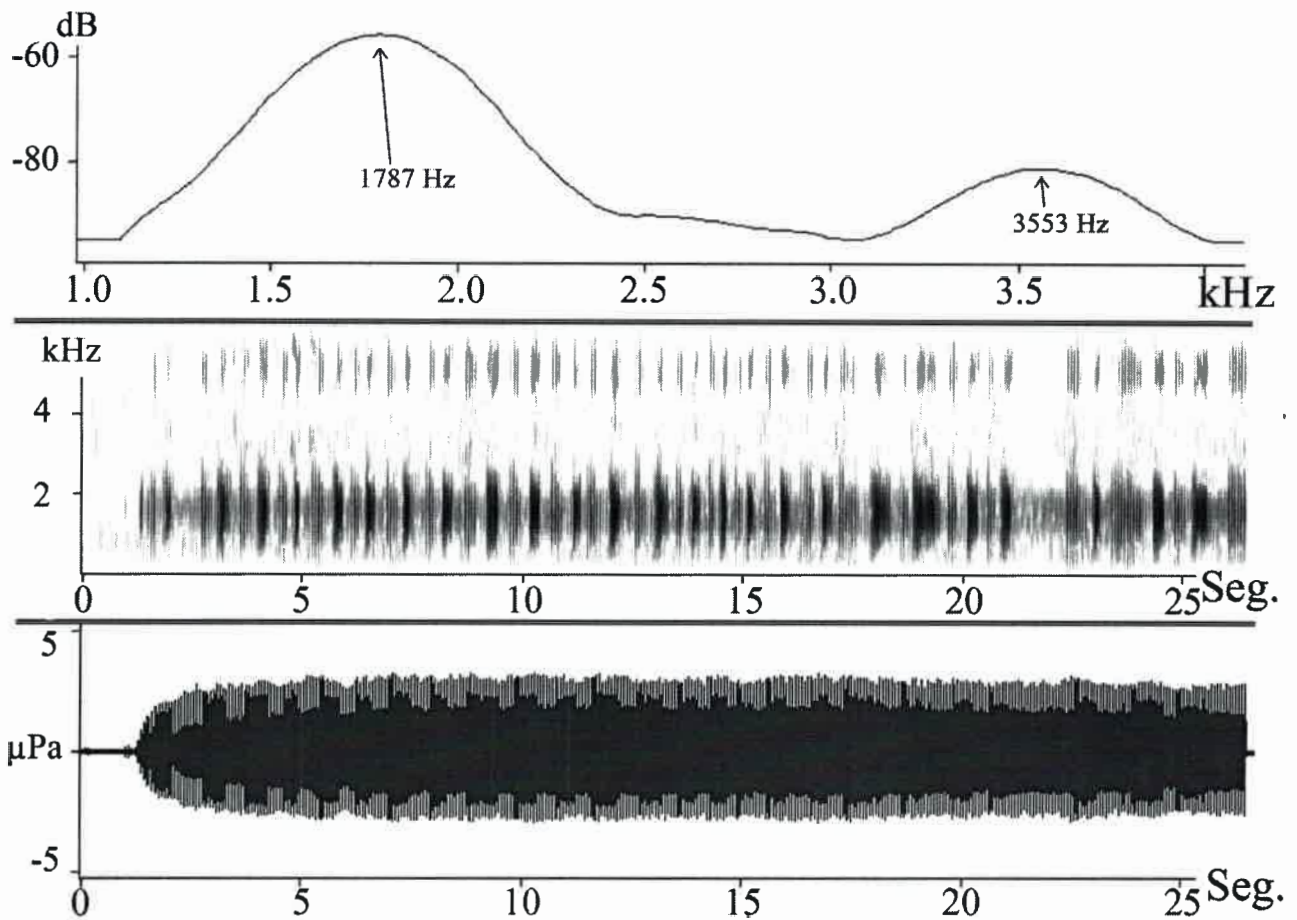


FIGURE 2. Advertisement call of *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos. Power spectrum (above), Sonogram (middle) and Oscillogram (below). Water temperature: 19.3°C.



FIGURE 3. Fragment of the advertisement call of *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos showing three tri-pulsed pulse groups. Water temperature: 19.3°C.

Cytogenetics. Forty-eight metaphases (seven individuals of the *Pleurodema* sp. nov. and three individuals of *Pleurodema kriegi*) were analyzed and the corresponding karyotypes were arranged (Fig. 5). The individuals of *Pleurodema kriegi* showed a tetraploid chromosomic complement ($2n=4x=44$), while the individuals of the new species showed an octoploid chromosomic complement ($2n=8x=88$).

Erythrometry. The erythrocyte size was significantly different between species (ANOVA, $F = 236.04$, $p < 0.0001$) with a bigger size in the specimens of the new species. (Table 4, Fig. 6 and 7).

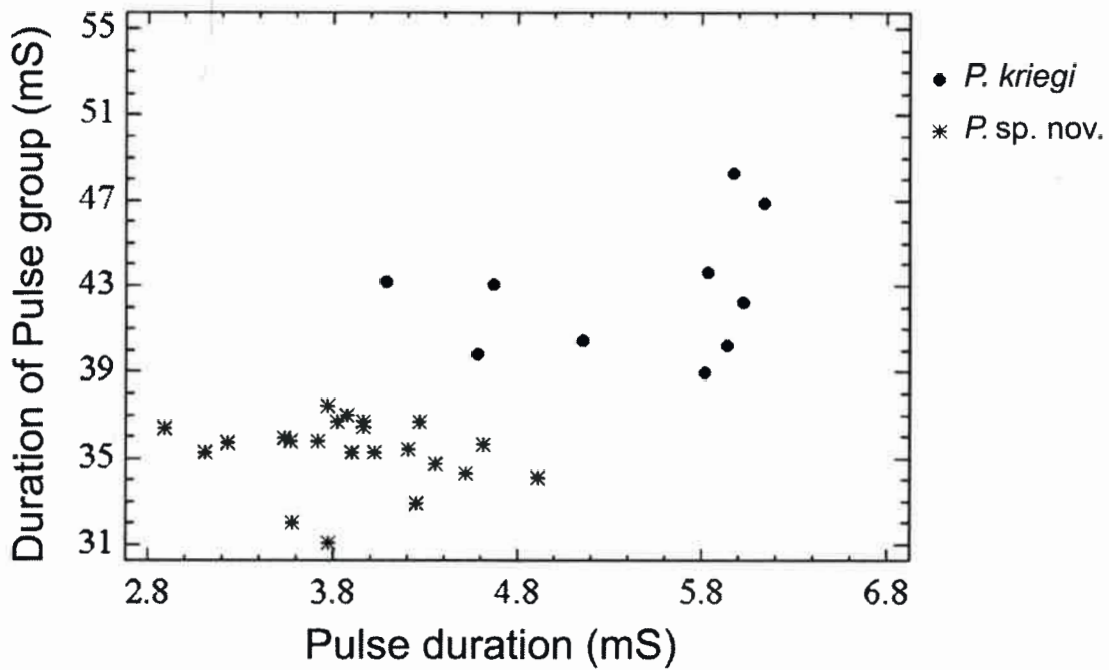


FIGURE 4. Scatter plot of duration of pulse group versus pulse duration. Individuals from La Posta (circles) and Estancia Los Tabaquillos (asterisks).

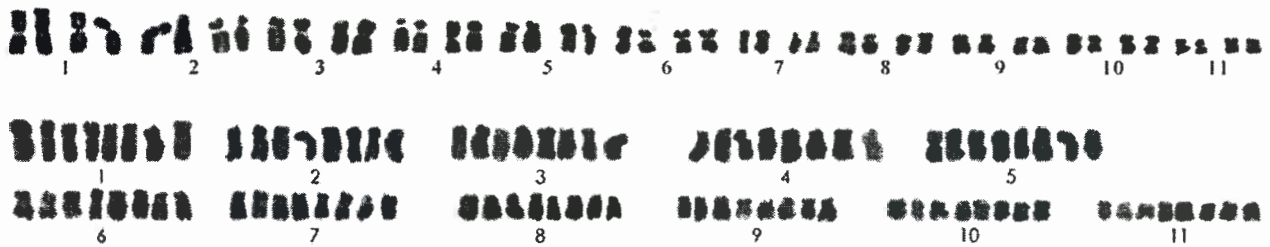


FIGURE 5. Karyotypes of two species of *Pleurodema* analyzed. *Pleurodema kriegi*, La Posta, Pampa de Achala, $2n=4x=44$ (above) and *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, $2n=8x=88$ (below). Photo by N. Salas.

Discussion

The external morphology of *Pleurodema kriegi* and the new species is quite similar although the morphometric comparisons showed significant differences. The discriminant analysis carried out with the morphometric variables showed a value of correct classification superior to 95% and 10 variables indicate statistically significant differences between both species (Table 1). However, unequivocal distinction between taxa based only on external morphology is not possible. Similar results were obtained by Martino and Sinsch (2002) in the morphometric differentiation between *Odontophrynus americanus* (tetraploid) and *O. cordobae* (diploid). Morphological differences could be interpreted as geographical variation (e.g. in other anuran species Heyer 1997; Schmalz & Zug 2002). However, further studies will be necessary to determine the interpopulation variability in *Pleurodema kriegi*.

The erythrometric analysis in both species helped us to detect differences at ploidy level. The octoploidy was confirmed by cytogenetic analysis. Thus, becoming the first discovery and report of an octoploid population to the genus *Pleurodema*.

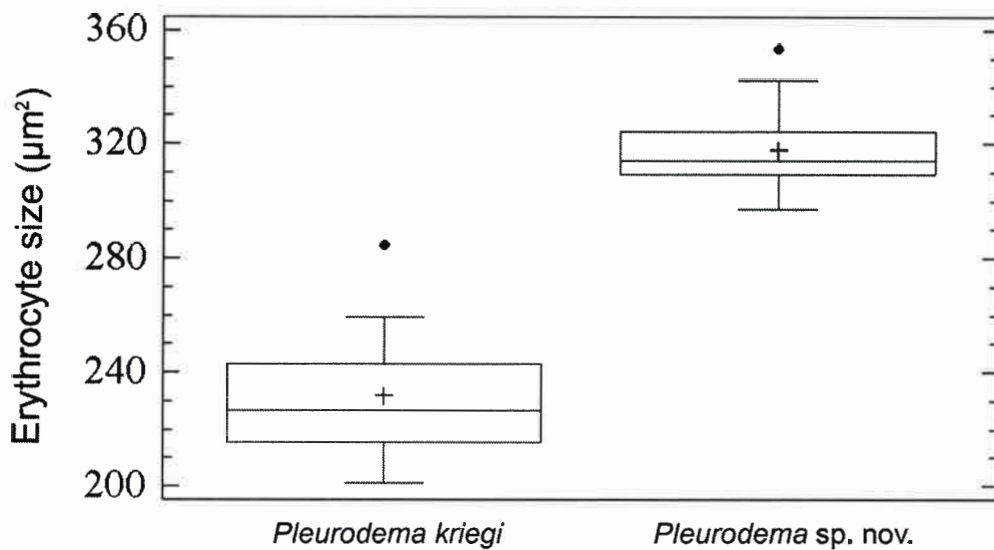


FIGURE 6. Box-and-Whisker plots of erythrocyte sizes for *Pleurodema kriegi* and *Pleurodema sp. nov.* from Estancia Los Tabaquillos. Upper and lower ends of boxes represent 75th and 25th percentiles. Whisker represent the minimum and the maximum values, except for outlier points. The center line within each box shows the locations of the sample median and the plus sign indicates the location of the sample mean.

TABLE 3. Features of pulse groups of the advertisement calls. Means, standard deviations and range refer to water temperature of 17.5-20.9°C in *Pleurodema kriegi* and 18.8–19.6°C in *Pleurodema sp. nov.* from Estancia Los Tabaquillos.

Pulse group variable	<i>Pleurodema kriegi</i>		<i>Pleurodema sp. nov.</i> Estancia Los Tabaquillos	
	n	Mean ± SD (Range)	n	Mean ± SD (Range)
First pulse duration [ms] *	10/23/69/207	4.87 ± 0.54 (4.05–5.70)	22/49/147/441	3.56 ± 0.61 (2.49–4.71)
First pulse interval [ms] *	10/23/69/207	14.17 ± 1.62 (12.15–16.94)	22/49/147/441	12.86 ± 1.32 (10.72–15.93)
Second pulse duration [ms] *	10/23/69/207	5.52 ± 0.75 (4.12–6.35)	22/49/147/441	4.00 ± 0.55 (2.91–4.96)
Second pulse interval [ms] *	10/23/69/207	10.88 ± 1.33 (8.97–12.91)	22/49/147/441	9.88 ± 1.17 (7.33–11.48)
Third pulse duration [ms] *	10/23/69/207	5.87 ± 1.26 (4.02–7.48)	22/49/147/441	4.13 ± 0.67 (3.10–5.13)

n= Individuals/Calls/ Number of pulse groups per call /Pulses)

* statistically different variables between populations (ANOVA, p<0.05)

Table 4: Mean, standard deviation and range of the erythrocyte areas (µm²) of two species of *Pleurodema* analyzed.

	n	Mean ± SD (Range)
<i>Pleurodema kriegi</i> (Tetraploid)	14	231.82 ± 21.46 (201.19–284.19)
<i>Pleurodema sp. nov.</i> from Est. Los Tabaquillos (Octoploid)	25	317.46 ± 13.43 (296.81–353.12)

n: sample size.

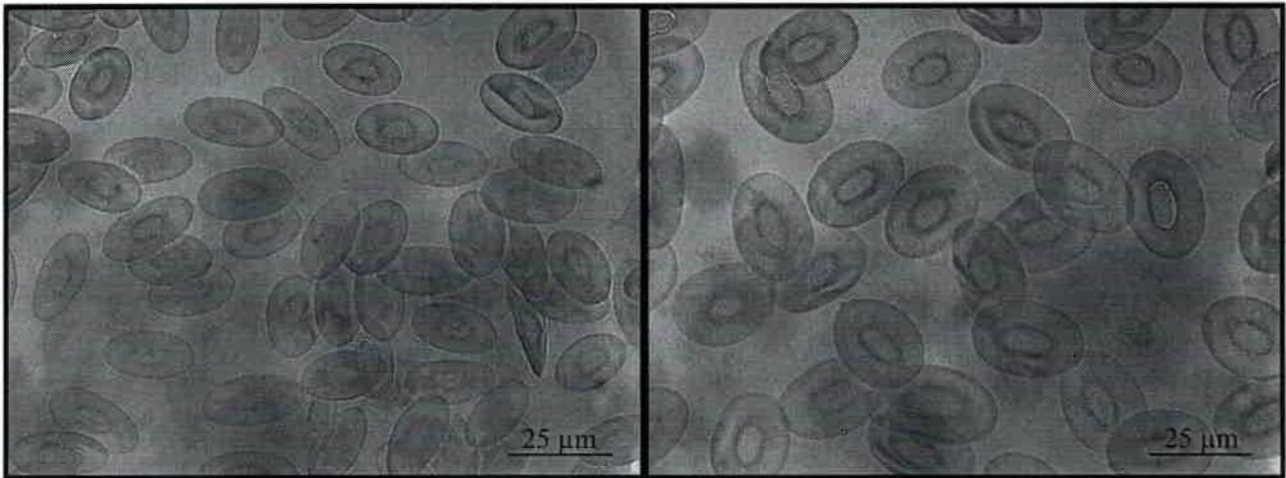


FIGURE 7. Erythrocyte sizes. *Pleurodema kriegi*, Pampa de Achala (left) and *Pleurodema* sp. nov. from Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones (right).

It has already been shown that differences in the advertisement call among anuran populations could suggest reproductive isolation (e.g. Bogart & Wasserman 1972; Platz & Forester 1988; Martino & Sinsch 2002) and that the advertisement calls of anurans are thus species-specific (Duellman & Trueb 1986). Moreover, in morphologically similar species but genetically different, differences in the pulse rate could be an important measure of reproductive isolation in species (Platz & Forester 1988; Angulo & Reichle 2008), mainly in cryptic species with different ploidy levels (Bogart & Wasserman 1972; Martino & Sinsch 2002). There are well-studied examples of species complexes with different ploidy levels that differ in the pulse rate, e.g. *Hyla crhoscelis* (2n)/*H. Versicolor* (4n) (Holloway *et al.* 2006); *Bufo viridis* complex 2n/4n (Stöck 1998); *Odontophrynus cordobae* (2n)/*O. americanus* (4n) (Martino & Sinsch 2002). Therefore, a differentiation of the acoustic properties of the advertisement call of octoploid individuals from *Pleurodema kriegi* could be expected if they represented a different species. We demonstrated that marked differences exist in the temporal properties of the advertisement call and the pulse rate is significantly higher in octoploid individuals than in *Pleurodema kriegi* (65.7 and 55.9 Pulses/sec., respectively). In our study, the octoploid individuals showed higher pulse rates, contrary to the *Bufo viridis* complex (Stöck 1998), *Odontophrynus cordobae*/*O. americanus* (Martino & Sinsch 2002)) and *Hyla crhoscelis*/*H. versicolor* (Holloway *et al.* 2006) where the pulse rate in the tetraploid species are smaller than their diploid counterparts.

Although the specimens collected in Sierra de Comechingones are morphologically cryptic regarding *Pleurodema kriegi* from Pampa de Achala, we have demonstrated that both species clearly differ in bioacoustic, erythrometric and cytogenetic features and we conclude that the population of *Pleurodema* from Sierra de Comechingones should be recognized as new species of the genus *Pleurodema*.

Pleurodema kriegi was described and assigned to the genus *Paludicola* by Müller (1926) on the basis of a female specimen collected in “Fuß der Sierra Grande von Cordoba”, Córdoba province, Argentine. Posteriorly, Parker (1927) includes it in the synonymy of *Pleurodema cinerea* (now *Pleurodema cinereum*). In 1968, after forty four years from the first discovery of *Pleurodema kriegi* in Sierra Grande of Cordoba by Krieg, *Pleurodema kriegi* is rediscovered in Pampa de Achala, Córdoba by Claudio and Mario Stiebel. Gallardo (1968) studied this material and it was synonymized with *Pleurodema darwinii* from Uruguay (now *Pleurodema bibroni*) and he made a redescription of the species on the basis of an adult male (MACN 24930), also he studied material from Uruguay and ten additional individuals from Pampa de Achala. Barrio and Rinaldi de Chieri (1970) performed a cytogenetic analisis of eight species of the genus *Pleurodema* and they concluded that the entity from Córdoba is a different species from that of Uruguay. In addition, Laurent (1975) by means of biometric and coloration comparisons ratifies two different entities on the basis of individuals from Pampa de Achala (Córdoba province, Argentina) and Uruguay.

In this work, the presence of a new species of the genus *Pleurodema* that inhabits the Sierra de Comechingones, an orographic formation at Sierra Grande of Córdoba, is determined. This new species is cryptic and allopatric regarding *Pleurodema kriegi* of Pampa de Achala, an orographic formation at Sierra Grande, too (Ramos 1999). The holotype of *Pleurodema kriegi* originally deposited in the Zoologische Staatssammlung München (ZSM 138/1925) is actually “lost”, may be destroyed during World War II (Glaw and Franzen 2006). Moreover, the *Pleurodema kriegi* description (Müller 1926) is quite poor and the description of the type locality is somewhat vague. Therefore, according to the article 75 of The International Code of Zoological Nomenclature (ICZN 1999), it is necessary to carry out a description and to assign a neotype to *Pleurodema kriegi* to be able to solve the nomenclatural problem among the two species of *Pleurodema* of the Sierra Grande of Córdoba. Qualifying conditions established by the ICZN (1999) when describing a neotype include (art. 75.3.1) the existence of “a statement that it is designated with the express purpose of **clarifying the taxonomic status or the type locality** of a nominal taxon”, (art. 75.3.5) the existence of “evidence that the neotype is consistent with what is known of the former name-bearing type from the original description and from other sources; however, a neotype may be based on a **different sex** or life stage if necessary or desirable to secure stability of nomenclature”, and (art. 75.3.6) “evidence that the neotype came as nearly as practicable from the **original type locality**...”.

Regarding to the type locality of the neotype, La Posta is a locality of Pampa de Achala comprehended within Sierra Grande, the broad type locality of *Pleurodema kriegi* given by Müller (1926). Müller indicated “Fuß der Sierra Grande von Cordoba”, but this species was never found in Sierra Grande inferior to altitudes to 2000 m.a.s.l. (Barrio 1977; J. Valetti, I. di Tada and A. Martino, unpublished data). Most studies on *Pleurodema kriegi*, since the original description of Müller (1926), were realized with specimens from Pampa de Achala (e.g. Gallardo 1968; Barrio & Rinaldi de Chieri 1970; Laurent 1975, Barrio 1977), and for this reason we select specimens from La Posta, Pampa de Achala, to redescribe *Pleurodema kriegi* and design a neotype.

Re-description of *Pleurodema kriegi* (Müller, 1926)

Fig. 8

Paludicola kriegi Müller, 1926.

Pleurodema kriegi di Tada, Salusso and Martori, 1976.

Material. Neotype. FML 20460, adult male (Fig. 8) near La Posta (31°36'46" S, 64°52'29" W, approximately 2151 m elevation), Pampa de Achala, Córdoba province, Argentina (Fig. 1), collected during the night of 17 January 2006 by Julián A. Valetti.

Referred specimens. (17 specimens). FML 20459, 20461, 20463–20471, 20474–20476, fourteen adult males and FML 20462, 20472–20473, three adult females, all collected with the neotype.

Diagnosis. A small species of *Pleurodema* (33.24 mm SVL), characterized by: (1) relatively small size; (2) snout short, canthus rostralis rounded in dorsal view and truncate in profile; (3) lumbar glands present, 1 ½ eye diameter; (4) round tympanic annulus, almost concealed; (5) tympanum length half of the eye diameter; (6) vomerine teeth absent, (7) commissural gland prominent; (8) brilliant red-orange spots on the groin and around lumbar glands; (9) ploidy level $2n=4x=44$; (10) axillary amplexus; (11) egg deposition in gelatinous nest attached to vegetation; (12) compound advertisement call with tri-pulsed pulse groups, average dominant frequency 1823 Hz.

According to external morphology, *Pleurodema kriegi*, *Pleurodema bibroni* and the new species described below are cryptic and the properties of their advertisement calls are similar (see above). *Pleurodema kriegi* differs from the new allopatric species from Sierra de Comechingones by having tetraploid chromosomal complement (octoploid in the new species) and by having a lower pulse rate (55.9 pulses/sec in *Pleurodema kriegi* and 65.7 pulses/sec in the new species). *Pleurodema kriegi* and *Pleurodema bibroni* are the only tetraploid species of the genus. They are morphologically very similar and although Laurent (1975) found some morphological differences between these entities, an unequivocal distinction between these taxa is not possible. The advertisement call of *Pleurodema kriegi* is similar to *Pleurodema bibroni*, too. Barrio (1977) detected difference in the pulse rate between these taxa, although the temperatures of recording are different and this environmental variable can affect this temporal variable of the call; Kolenc *et al.* (2009) found no acoustic differences between these two species. Barrio and Rinaldi de Chieri (1970) found secondary constrictor chromosomes 12 only in *Pleurodema kriegi*. Ultimately, *Pleurodema kriegi* and *P. bibroni* were considered as distinct species by Barrio (1977) based mostly on biogeographic and ecologic differences.

Pleurodema kriegi is distinguished markedly from *P. tucumanum*, *P. nebulosum*, *P. guayapae*, *P. marmoratum* and *P. diplolister* by the presence of lumbar glands (lumbar glands absent in these species); from *P. bufoninum*, *P. borellii*, *P. cinereum* and *P. thaul* by the presence of advertisement call compound by tri-pulsed pulse groups (absent in *P. bufoninum*, Duellman & Veloso 1977; formed by a single pulse group in *P. borellii* and *P. cinereum*, McLister *et al.* 1991; and formed by pulse groups of 5-6 pulses in *P. thaul*, Barrio 1977); from *P. brachyops* by having lumbar glands bigger than eye diameter (smaller in *P. brachyops*), yellow lumbar glands with black central ocellus (black lumbar glands with whitish central blotches in *P. brachyops*), tympanum size half of the eye diameter (smaller than half eye diameter in *P. brachyops*).

Description of the neotype. The neotype (FML 20460, Fig. 8) is an adult male of 34.4 mm, body robust; head triangular, slightly wider than long; snout short, canthus rostralis rounded and vertically truncated. Eyes protuberant; eye diameter larger than interocular distance; interocular distance larger than internarinal interval. Round tympanic annulus almost concealed, approximately half the size of eye diameter. Commissural glands present, oval, approximately the same size of eye diameter. Vomerine teeth absent. Dark vocal sac. Fingers free; relative length of fingers: $3 > 4 > 1 > 2$; two not-darkened palmar tubercles (Fig. 8). Femur length less than tibia length; sum of femur length and tibia length longer than foot length. Toes free with cutaneous edge and rudimentary interdigital basal membrane; two metatarsal tubercles, inner metatarsal tubercle pointed and outer metatarsal tubercle shovel-shaped (Fig. 8); relative length of toes: $4 > 5 = 3 > 2 > 1$. Lumbar glands large, oval, one and a half times the size of eye diameter. Vocal sacs single, median and subgular. In life, dorsally brownish with large almost symmetrical dark spots. Dark transverse bands on upper surface of arms and legs. Yellow lumbar glands with a black central ocellus covering 60% of the gland. Brilliant red-orange spots on the groin and around lumbar glands. Dark palms and soles, with whitish palmar tubercles. Dark vocal sac with the rest of ventral body surface whitish and mild dotted dark. Iris gold with black reticulations. The neotype is ventrally very infected by the sub-cutaneous acari *Hannemania achalai* Alzuet and Mauri, 1987.

Morphometric measures of neotype (mm): Snout-vent length 34.4; maximal head width 13.6; head length 11.5; snout-eye distance 5.0; internarinal distance 1.9; interocular distance 2.7; eye-narinal distance 2.7; rostronarinal distance 3.2; eye diameter 3.6; arm length 16.1; length of 3rd finger 4.6; femur length 15.0; tibia length 15.8; foot length (including tarsal length) 22.5; length of 3rd toe 5.2; length of 4th toe 9.1.

Distribution. The species is currently known from Pampa de Achala, Córdoba province (Fig. 1) (see Barrio 1977, Kolenc *et al.* 2009) and cited to near Alpa Corral, Córdoba province by Ávila and Priotto (1995). However, the last record should be corroborated because the locality is to the south of the new species with octoploid chromosomal complement and the specimens could be octoploid, too.

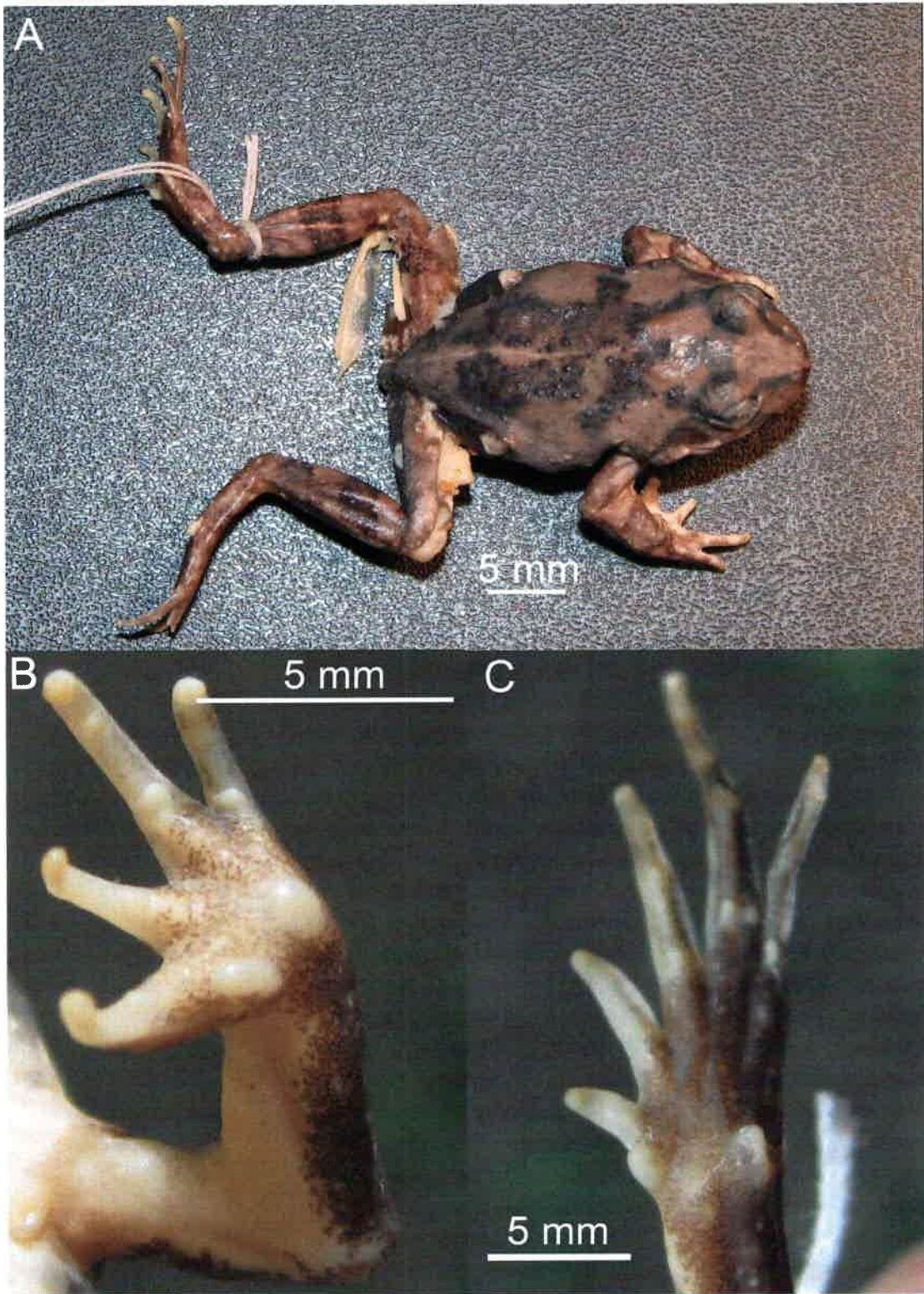


FIGURE 8. *Pleurodema kriegi*, neotype (FML 20460, SVL 34.4 mm), (A) dorsal view of specimen; ventral views of (B) hand and (C) foot. Photograph by J. Valetti.



FIGURE 9. Typical habitat of *Pleurodema kriegi*. La Posta, Pampa de Achala. Córdoba province, Argentina. Photograph by J. Valetti and A. Martino.

Ecology. *Pleurodema kriegi* males were acoustically active from the first rains of austral spring (November) to March from 21.00 hs. to 3.00 hr. (sunset time: 21.00 – 21.30 hr) *Pleurodema kriegi* breeds in temporary and semipermanent ponds with vegetation at the edges, or aquatic vegetation, and 10 to 40 cm deep (Fig. 9). The males emit their calls floating in the surface of the water or underground near the edge of ponds. The eggs are deposited in semisubmerged eggs-masses and adhered to the aquatic vegetation. The amplexus is axillary. This species was observed in sympatry with *Rhinella achalensis*, and in syntopy with *R. arenarum*, *Odontophrynus achalensis* and *Hypsiboas cordobae*.

The tadpole of *Pleurodema kriegi* was recently redescribed by Kolenc *et al.* (2009) and a comparison with *Pleurodema bibroni* was performed.

Species description

Pleurodema cordobae sp. nov.

Fig. 10

Material. Holotype. FML 20490, adult male (Fig. 11) from Estancia Los Tabaquillos (32°23'58.4" S, 64°55'35.1" W, approximately 2105 m elevation), Sierra de Comechingones, Córdoba province, Argentina (Fig. 1), collected during the night of 05 February 2006 by Adolfo L. Martino and Julián A. Valetti.

Paratypes (9 specimens). FML 20492, adult female and FML 20484–20489, 20491, eight adult males, all collected with the holotype.

Diagnosis. A small species of *Pleurodema* (35.41 mm SVL) with lumbar glands and chromosomic complement octoploid. The new species is distinguished from other species of the genus *Pleurodema* by the

following combination of characters: (1) relatively small size; (2) snout short, canthus rostralis rounded in dorsal view and truncate in lateral view; (3) lumbar glands present, $1\frac{1}{2}$ eye diameter; (4) round tympanic annulus, almost concealed; (5) tympanum length half of the eye diameter; (6) vomerine teeth absent, (7) commissural gland prominent; (8) brilliant red-orange spots on the groin and around lumbar glands; (9) ploid level $2n=8x=88$; (10) axillary amplexus; (11) egg deposition in gelatinous nest attached to vegetation; (12) compound advertisement call with tri-pulsed pulse groups, average dominant frequency 1787 Hz.

According to external morphology, *Pleurodema kriegi*, *Pleurodema bibroni* and *Pleurodema cordobae* **sp. nov.** are cryptic and the properties of their advertisement calls are very similar. *Pleurodema cordobae* **sp. nov.** is the only octoploid species of the genus (*P. kriegi* and *P. bibroni* are tetraploid and the rest of species are diploid; Brum-Zorrilla & Sáez, 1968; Barrio & Rinaldi de Chieri, 1970; Veloso *et al.*, 1972; Duellman & Veloso, 1977; Schmid *et al.*, 1993; Lourenço *et al.*, 2006). Morphometric comparisons indicate differences between *Pleurodema cordobae* **sp. nov.** and *P. kriegi* (Table 1). However, there are no morphometric measures that allow a precise identification between both *taxa*. The temporal variables of the advertisement call differ from *P. kriegi* (Table 2) and the pulse rate is higher than *P. kriegi*. The erythrocyte size of *Pleurodema cordobae* **sp. nov.** is significantly bigger than *P. kriegi* (Table 4) near $100\ \mu\text{m}^2$.



FIGURE 10. Adult male of *Pleurodema cordobae* **sp. nov.** from Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones, Córdoba province, Argentina. Photograph by A. Martino and J. Valetti.

Pleurodema cordobae **sp. nov.** is distinguished markedly from *P. tucumanum*, *P. nebulosum*, *P. guayapae*, *P. marmoratum* and *P. diplolister* by the presence of lumbar glands; from *P. bufoninum*, *P. borellii*, *P. cinereum* and *P. thaul* by the presence of advertisement call compound by tri-pulsed pulse groups (absent in *P. bufoninum*, Duellman & Veloso 1977; formed by a single pulse group in *P. borellii* and *P. cinereum*, McLister *et al.* 1991; and formed by pulse groups of 5-6 pulses in *P. thaul*, Barrio, 1977); from *P. brachyops* by having lumbar glands bigger than eye diameter (smaller in *P. brachyops*), yellow lumbar glands with black central ocellus (black lumbar glands with whitish central blotches in *P. brachyops*), tympanum size half of the eye diameter (smaller than half eye diameter in *P. brachyops*).

Sixteen morphometric distances of the type series describe the quantitative morphological features of the new species (Table 5).

Description of the holotype. The holotype (FML 20490, Fig. 11) is an adult male of 35.2 mm (Table 5), body robust; head triangular slightly wider than long; snout short, canthus rostralis rounded in dorsal view and truncated in lateral view. Eyes protuberant; eye diameter equal to interocular distance; interocular distance larger than internarinal interval. Round tympanic annulus almost concealed, approximately half the size of eye diameter, Commissural glands present, oval, approximately the same size of eye diameter. Vomerine teeth absent. Dark vocal sac. Fingers free; relative length of fingers: $3>4>1>2$; two not-darkened palmar tubercles (Fig. 11). Femur length less than tibia length; sum of femur length and tibia length longer than foot length.

Toes free with cutaneous edge and rudimentary interdigital basal membrane; two metatarsal tubercles (Fig. 11); relative length of toes: $4 > 5 = 3 > 2 > 1$. Lumbar glands large, oval, one and a half times the size of eye diameter. Vocal sacs single, median and subgular. In life, dorsally brownish with large almost symmetrical dark spots. Dark transverse bands on upper surface of arms and legs. Yellow lumbar glands with a black central ocellus covering 60% of the gland. Brilliant red-orange spots on the groin and around lumbar glands. Dark palms and soles, with whitish palmar tubercles. Dark vocal sac, with the rest of ventral body surface being whitish and mild dotted dark. Iris gold with black reticulations.

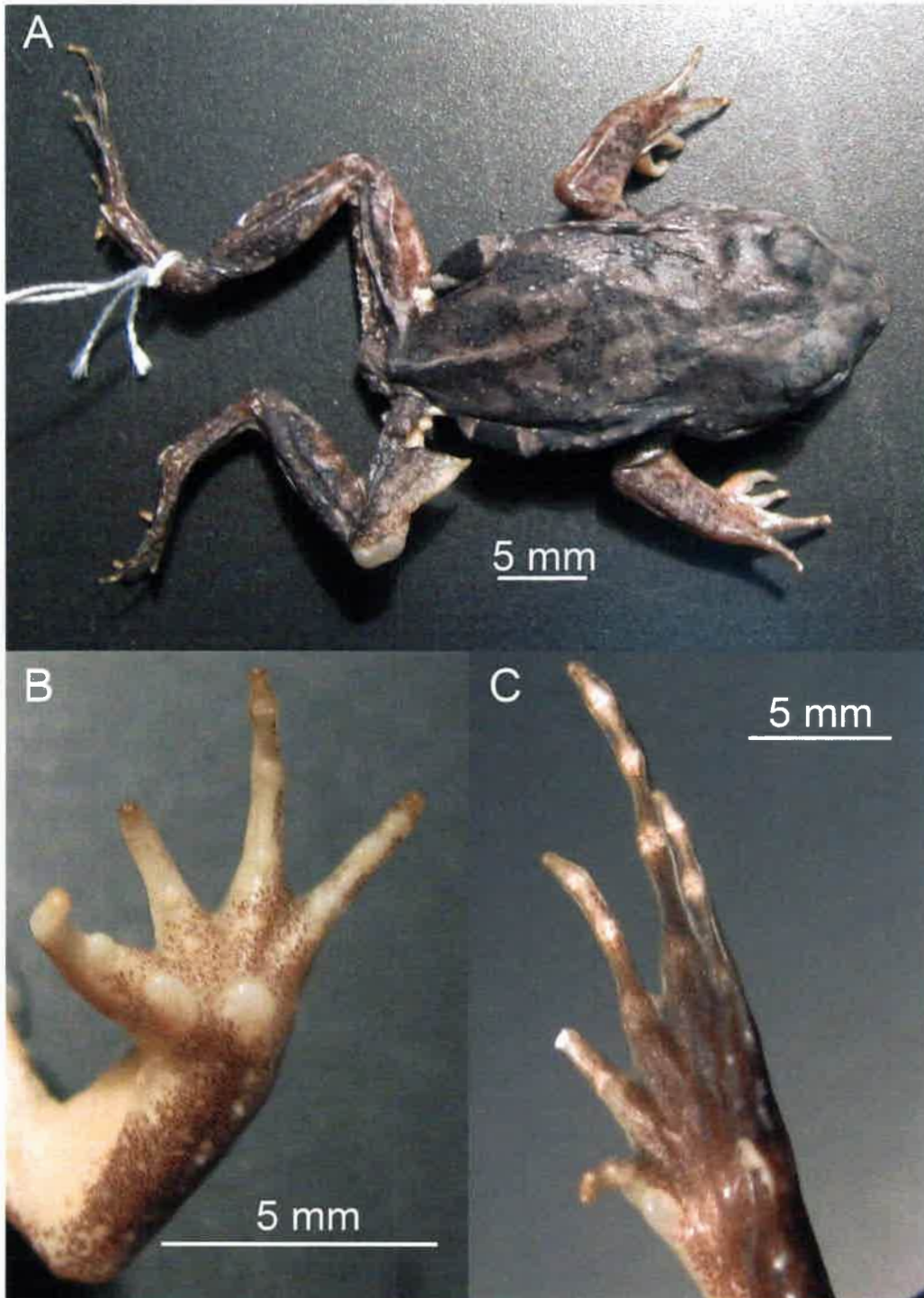


FIGURE 11. *Pleurodema cordobae* sp. nov., holotype (FML 20490, SVL 32.22 mm), (A) dorsal view of specimen; ventral views of (B) hand and (C) foot. Photograph by J. Valetti.



FIGURE 12. Type locality of *Pleurodema cordobae* sp. nov. Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones. Córdoba province, Argentina. Photograph by J. Valetti and A. Martino.

TABLE 5. Morphometric features of the type series of *Pleurodema cordobae* sp. nov. which were collected at Est. Los Tabaquillos, Córdoba. All data are given in [mm]. (1) snout-vent length (SVL); (2) maximal head width; (3) head length; (4) snout-eye distance; (5) internarinal distance; (6) interocular distance; (7) eye-narinal distance; (8) rostronarinal distance; (9) eye diameter; (10) arm length; (11) length of 3rd finger; (12) femur length; (13) tibia length; (14) foot length; (15) length of 3rd toe; (16) length of 4th toe. FML = Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina. M= male; F= female.

	sex	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Holotype									
FML 20490	M	35.2	13.1	12.8	5.7	2.1	3.5	3.0	3.5
Paratype									
FML 20492	F	42.9	15.5	15.5	6.7	2.6	3.9	3.5	4.4
FML 20483	M	34.3	12.7	13.5	5.2	2.0	2.9	2.8	3.3
FML 20484	M	35.1	14.0	14.4	5.4	2.3	2.6	2.8	3.1
FML 20485	M	37.5	13.5	14.4	5.3	2.0	3.3	3.2	3.1
FML 20486	M	34.0	12.0	13.2	5.0	2.0	2.9	2.7	2.9
FML 20487	M	35.1	13.8	13.0	5.2	2.0	3.6	2.6	3.1
FML 20488	M	35.0	12.6	13.0	5.7	2.0	3.1	2.5	2.8
FML 20489	M	32.7	12.2	12.8	5.4	2.4	2.9	2.7	3.3
FML 20491	M	35.2	13.7	11.7	5.6	2.2	3.1	2.7	3.3

continued.

	sex	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
Holotype									
FML 20490	M	3.6	16.0	4.5	13.6	15.0	22.5	5.6	9.1
Paratype									
FML 20492	F	4.0	20.5	6.6	18.3	19.9	30.0	6.5	12.1
FML 20483	M	3.8	16.0	5.2	16.1	16.6	25.0	5.5	9.8
FML 20484	M	3.7	15.0	5.0	15.3	16.6	25.0	5.4	10.3
FML 20485	M	3.6	18.1	5.9	16.6	17.1	27.3	5.6	10.8
FML 20486	M	3.3	16.2	5.2	14.7	15.3	23.8	5.1	8.4
FML 20487	M	3.6	16.3	5.4	14.1	13.3	24.9	5.7	10.5
FML 20488	M	2.5	16.2	4.6	15.5	15.7	23.5	5.0	9.5
FML 20489	M	3.5	16.3	5.4	14.8	15.7	23.8	5.5	9.6
FML 20491	M	3.6	15.8	5.3	15.6	16.5	25.0	5.5	10.3



FIGURE 13. Typical localization of calling male of *Pleurodema cordobae* sp. nov. Type locality, Estancia Los Tabaquillos, Córdoba province, Argentina. Photograph by A. Martino and J. Valetti.

Distribution. The species is currently known from *Terra typica*, Estancia Los Tabaquillos (Fig. 1) and two temporary ponds located 5 kilometers away from the former.

Ecology. *Pleurodema cordobae* sp. nov. males were acoustically active from December to March (Austral summer) from 21.00 hs. to 4.00 hr. (sunset time: 21.00 – 21.30 hr) *Pleurodema cordobae* breeds in temporary and semipermanent ponds with vegetation at the edges and a depth of 20 to 30 cm (Fig. 12). The

males emit their calls floating on the surface of the water near the edge of ponds (Fig. 13). The eggs are deposited in semisubmerged eggs-masses and adhered to the vegetation (Fig. 14). The amplexus is axillary. This species was observed in syntopy with *Rhinella achalensis*, *R. arenarum*, *Odontophrynus achalensis* and *Hypsiboas cordobae*.

Etymology. The specific name (a noun in the genitive case) refers to the currently known geographical distribution of the new species.



FIGURE 14. Egg deposition mode of *Pleurodema cordobae* sp. nov. Eggs mass and small tadpoles hatching. Estancia Los Tabaquillos, Córdoba province, Argentina. Photograph by A. Martino and J. Valetti.

Acknowledgments

We thank Pablo Grenat and Pablo Brandolin for help in field work, Ricardo Martori for facilitating the microscope to measure the erythrocytes and Susan Vilor for her assistance with the English review. We are very grateful to Ulrich Sinsch, Frank Glaw and Miguel Vences for help us to solve the nomenclatural problem between *Pleurodema kriegi* and *Pleurodema cordobae* sp. nov. and we also acknowledge Miguel Vences and the anonymous reviewers for their useful comments and suggestions on the manuscript. The access and field work in Parque Nacional Quebrada de Los Condoritos were provided by Delegación Técnica de Parques Nacionales whose cooperation is greatly appreciated. The Secretary Research and Technology of National University of Río Cuarto (SECyT-UNRC) provided funds by Grant PPI 18/C288. The first author thanks CONICET – Argentina (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) for postgraduate fellowship granted.



Reference

- Alzuet, A.B. de & Mauri, R.A. (1987) Ácaros Trombiculidae del género *Hannemania* Oudemans, endoparásitos de anfibios. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 44 (2), 111–116.
- Angulo, A. & Reichle, S. (2008) Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 152, 59–77.
- Ávila, L.J. & Priotto, J.W. (1995) Geographic Distribution. *Pleurodema kriegi*. *Herpetological Review*, 26 (2), 106.
- Barrio, A. (1977) Aportes para la elucidación del "status" taxonómico de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *Pleurodema kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 37(93), 311–331.
- Barrio, A. & Rinaldi de Chieri, P. (1970) Estudios citogenéticos sobre el género *Pleurodema* y sus consecuencias evolutivas (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 30(80), 309–319.
- Beçak, M.L. & Beçak, W. (1998) Evolution by polyploidy in Amphibia: New insights. *Cytogenet Cell Genet*, 80, 28–33.
- Bogart, J.P. (1980) Evolutionary significance of polyploidy in amphibians and reptiles. In: Lewis, W (Ed), *Polyploidy: biological relevance*. Plenum Press, New York, pp. 341–378.
- Bogart, J.P. & Wasserman, A.O. (1972) Diploid-polyploid species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics*, 11, 7–24.
- Brum-Zorrilla, N. & Sáez, F.A. (1968) Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia Anura). *Experientia*, 24, 969.
- Cabrera, M.R. (1996) Lista y distribución geográfica de saurios, anfibios y tortugas (Amniota, Reptilia) de la provincia de Córdoba. In: di Tada, I.E. & Bucher, E.H. (Eds.), *Biodiversidad de la Provincia de Córdoba. Fauna. Vol. I*, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, pp. 215–238.
- Cei, J.M. (1972) Segregación corológica y procesos de especiación por aislamiento en anfibios de la Pampa de Achala, Córdoba. *Acta Zoológica Lilloana*, 29, 233–246.
- Cei, J.M. (1987) Additional notes to Amphibians of Argentina: An update, 1980-1986. *Monitore Zoologico Italiano*.(N.S.), 21, 209–272.
- Charif, R.A., Mitchell, S. & Clark, C.W. (1995). *Canary 1.2 user's manual*. Ithaca, New York: Cornell Laboratory of Ornithology, 229 pp.
- di Tada, I.E., Saluso, M.M. & Martori, R. (1976). Lista de los batracios de Córdoba. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*, 51(3-4), 325–362.
- di Tada, I.E., Barla, M.J., Martori, R.A. & Cei, J.M. (1984) *Odontophrynus achalensis*. Una nueva especie de anfibio de la Pampa de Achala (Córdoba, Argentina). *Historia Natural*, 4(17), 149–155.
- di Tada, I.E., Zavattieri, M.V., Bridarolli, M.E., Salas, N.E. & Martino, A.L. (1996) Anfibios Anuros de la Provincia de Córdoba. In: di Tada, I.E. & Bucher, E.H. (Eds.), *Biodiversidad de la Provincia de Córdoba. Fauna. Vol. I*, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, pp. 191–213.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibian*. McGraw Hill Inc., USA, 670 pp.
- Duellman, W.E. & Veloso, A. (1977) Phylogeny of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae): A biogeographic model. *Occasional papers, Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas*, 64, 1–46.
- Frost, D.R. (1985) *Amphibian species of the world. A review of amphibian species of the world: A taxonomic and geographical reference*. Allen Press, Inc. and The Association of Systematic Collection. Lawrence, KA. 732 pp.
- Frost, D.R. (2008) Amphibian Species of the World: an online reference, version 5.2, American Museum of Natural History, New York, USA. Available from <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php> (accessed 1 January 2009).
- Gallardo, J.M. (1964) Los géneros *Urostrophus* Dumeril et Bibron y *Cupriganos* gen. nov. (Sauria, Iguanidae) y sus especies. *Neotropica*, 10, 125–136.
- Gallardo, J. M. (1968) Sobre la validez de algunas especies Argentinas de *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 28(76), 135–144.
- Gerhardt, H.C. (1978) Temperature coupling in the vocal communication system of the gray tree frog *Hyla versicolor*. *Science*, 199, 992–994.
- Glaw, F & Franzen, M. (2006) Type catalogue of amphibians in the Zoologische Staatssammlung München. *Spixiana*, 29(2), 153–192.
- Hayek, L.C., Heyer, R.W. & Gascon, C. (2001) Frog morphometrics: a cautionary tale. *Alytes*, 18, 153–177.
- Heyer, W.R. (1975) A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 199, 1–55.
- Heyer, W.H. (1997) Geographic variation in the frog genus *Vanzolinius* (Anura: Leptodactylidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 110, 338–365.
- Holloway, A.K., Cannatella, D.C., Gerhardt, H.C. & Hillis, D.M. (2006) Polyploids with different origins and ancestors form a single sexual polyploid species. *The American Naturalist*, 167, E88–E101.
- ICZN (1999) *International Code of Zoological Nomenclature*, International Trust for Zoological Nomenclature, London,

- Kawamura, T. (1984) Polyploidy in amphibians. *Zoological Science*, 1, 1–5.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Baldo, D., Ferraro, D. & Prigioni, C. (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*, 1969, 1–35.
- Laurent, R.F. (1975) Diferenciación biométrica entre dos poblaciones similares de *Pleurodema*. *Acta Zoológica Lilloana*, 31(10), 99–106.
- Levan, A., Frega, K. & Sandberg, A. (1964) Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201–220.
- Lourenço, L.B., Nascimento, J.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(4), 481–489.
- Lynch, J.D. (1971) *Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs*. University of Kansas. Museum of Natural History. Miscellaneous publication no. 53, 238 pp.
- Martino, A. & Sinsch, U. (2002) Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus* *Journal of Zoology* (London), 257, 67–81.
- McLister, J.D., Loughheed, S.C. & Bogart, J.P. (1991) Electrophoretic and vocalization comparisons among three leptodactylid frogs (*Pleurodema* spp) from northwestern Argentina. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2397–2403.
- Miró, R.C. (1999) El basamento Precámbrico-Paleozoico Inferior de las Sierras Pampeanas, Famatina, Cordillera Oriental y Puna. In: Caminos, R. (Ed.), *Geología Argentina*. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Anales 29, Buenos Aires, Argentina, pp. 133–167.
- Müller, L. (1926) Neve reptilien und Batrachier der Zoologischen Sammlung des bayrischen Staate. *Zoologischer Anzeiger, Leipzig*, 65, 193–200.
- Nascimento, L.B., Pimenta, B.V.S., Cruz, C.A.G. & Caramaschi, U. (2006) Taxonomic status of *Gomphobates marmoratus* Reinhardt and Lütken, 1862 1861 and *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *South American Journal of Herpetology*, 1(3), 166–174.
- Nöller, H.G. (1959). Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 269: 98–100.
- Orr, H.A. (1990) Why polyploidy is rarer in animals than in plants. Revisited. *The American Naturalist*, 136, 759–770.
- Otto, S.P. & Whitton, J. (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34, 401–437.
- Parker, H.W. (1927) A revision of the frogs of the genera *Pseudopaludicola*, *Physalaemus* and *Pleurodema*. *Annals and Magazine of Natural History* 9, 450–478.
- Platz, J.E. & Forester, D.C. (1988) Geographic variation in mating call among the four subspecies of the chorus frog: *Pseudacris triseriata* (Wied). *Copeia*, 1988, 1062–1066.
- Ralin, D.B. (1977) Evolutionary aspects of mating call variation in a diploid–tetraploid species complex of tree-frogs (Anura). *Evolution*, 31, 721–736.
- Ramos, V.A. (1999) Rasgos estructurales del territorio Argentino. I. Evolución tectónica de la Argentina. In: Caminos, R. (Ed.), *Geología Argentina*. Instituto de Geología y Recursos Minerales. Anales 29, Buenos Aires, Argentina, pp. 715–786.
- Rosset, S.D., Baldo, D., Lanzone, C. & Basso, N.G. (2006) Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 40 (4), 465–477.
- Schmalz, T.D. & Zug, G.R. (2002) Observations on geographic variation in the Asian frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Anura: Ranidae). *Hamadryad*, 27 (1), 90–98.
- Schmid, M. (1978) Chromosome banding in amphibia. 1. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66, 361–388.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W. Poot, M. (1993) Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 62, 42–48.
- Stöck, M. (1998) Mating call differences between diploid and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex) in middle Asia. *Amphibia-Reptilia*, 19, 29–42.
- Stöck, M. & Grosse, W.R. (1997) Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. *Alytes*, 15(2), 72–90.
- Stöck, M., Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Epplen, J.T., Grosse, W.R., Hock, R., Klapperstück, T., Lampert, K.P., Scheer, U., Schmid, M. & Schartl, M. (2002) A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. *Nature Genetics*, 30, 325–328.
- Veloso, A.M., Diaz, N.P., Galleguillos, R.G. (1972) Revisión cariosistémática de las especies del género *Pleurodema* en Chile (Anura: Leptodactylidae). *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso*, 6, 49–55.
- Wasserman, A.O. (1970) Polyploidy in the common tree toad *Hyla versicolor* Le Conte. *Science*, 167, 385–386.
- White, M.J.D. (1973). *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Pr Press, London, 961 pp.

Appendix: Specimens analyzed

Pleurodema cordobae sp. nov.

ARGENTINA: **Córdoba province:** Estancia Los Tabaquillos, Sierra de Comechingones (approximately 2105 m elevation); FML 20490 (Holotype); FML 20483–20489, FML 20491–20492 (nine Paratypes); FML 20477–20482, FML 20493–20505 (19 specimens).

Pleurodema kriegi

ARGENTINA: **Córdoba province:** La Posta, Pampa de Achala (approximately 2151 m elevation); FML 20460 (Neotype), FML 20459, 20461–20476 (17 specimens)



U N R C
Biblioteca Central



71259

71259