

Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Informe de pasantía, Licenciatura en Ciencias Biológicas, Orientación Ecología

Plasticidad fenotípica inducida por competencia en larvas de *Hypsiboas pulchellus*

Autor: *Bach. María Magdalena Carabio Foti*

Orientador: *Dr. Daniel E. Naya*. Departamento de Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias y Centro Universitario de la Regional Este, Universidad de la República, Montevideo – Maldonado, Uruguay..

Lugar de Ejecución: Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo - Uruguay. Iguá 4225, Piso 6, Ala Norte. Tel.: 25258618(7) Int142.



Tribunal:

- **Dr. Matías Arim**. Departamento de Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias y Centro Universitario de la Regional Este, Universidad de la República, Montevideo – Maldonado, Uruguay.
- **Dr. Héctor Romero**. Departamento de Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias y Centro Universitario de la Regional Este, Universidad de la República, Montevideo – Maldonado, Uruguay.

CONTENIDO

1. Resumen	3
2. Introducción	4
2.1 La plasticidad fenotípica	4
2.2 Plasticidad fenotípica en larvas de anuros	5
2.3 Plasticidad fenotípica en el tracto digestivo	5
3. Objetivos e hipótesis	6
3.1 Objetivo general	6
3.2 Hipótesis y predicciones	7
4. Materiales y métodos	7
4.1 Modelo de estudio	7
4.2 Diseño experimental	8
4.3 Análisis de datos	9
5. Resultados	10
5.1 Efecto de la disponibilidad de alimento sobre la supervivencia, desarrollo, tamaño corporal, morfología corporal e intestinal	11
5.2 Análisis de las relaciones causales entre variables	11
5.3 Efectos no lineales de la disponibilidad de alimento	17
6. Discusión	19
6.1. Efectos de la disponibilidad de alimento sobre la adecuación biológica	19
6.2. Evaluación de las hipótesis de partida	20
6.3. Efectos no lineales de la disponibilidad de alimento	22
6.4. Consideraciones finales y perspectivas	23
7. Agradecimientos	24
8. Referencias	24

1. RESUMEN

En los últimos años los estudios sobre la plasticidad fenotípica, han cobrado gran importancia tanto en ecología como en evolución. Un modelo ampliamente utilizado para analizar los determinantes y características de la plasticidad han sido las larvas de anfibios anuros. En dicho modelo se han encontrado respuestas plásticas frente a diversas señales ambientales, destacándose por su importante rol ecológico las siguientes tres: desecación, incidencia de depredación y cantidad de recursos disponibles (competencia). Estos tres factores originan patrones de respuesta que involucran cambios en la morfología, comportamiento y estrategia de desarrollo, entre otros. El presente estudio representa uno de los primeros trabajos llevados a cabo en la región destinado a analizar los cambios morfológicos asociados a la disponibilidad de alimento como causante de plasticidad fenotípica, utilizando como modelo larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Este estudio fue realizado en el laboratorio: el diseño experimental planteado fue un diseño completamente aleatorio y como variables de respuesta fueron medidas la masa corporal (peso húmedo, con y sin intestino, y peso seco), el largo de cuerpo y el largo total, el volumen del cuerpo y el volumen total, el estadio de desarrollo, el largo y la masa del intestino (peso húmedo y seco). Mediante análisis de vías, se logró establecer una ruta de causalidades: la disponibilidad de alimento influye directamente sobre la masa corporal y sobre la masa del intestino; la masa corporal, a su vez, influye sobre el estadio de desarrollo y éste sobre la forma del cuerpo. Además, existe una influencia directa, pero no lineal, de la disponibilidad de alimento sobre el desarrollo y sobre la forma del cuerpo.

Palabras clave: plasticidad fenotípica, competencia intraespecífica, larvas de anfibio

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *La plasticidad fenotípica*

La plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, tanto bióticas como abióticas (Begon et al., 2006; Whitman & Agrawal, 2009). Este fenómeno ha sido demostrado en un gran número de organismos, incluyendo bacterias, plantas y animales (Pigliucci, 2001; Whitman & Agrawal, 2009). La forma más común de representar la plasticidad es a través de una “norma de reacción”, esto es, a través de una función genotipo-específica que relaciona el valor de un rasgo fenotípico con el ambiente en el cual dicho valor se observa. En otras palabras, una norma de reacción es la trayectoria desarrollada por un genotipo en el espacio ambiente-fenotipo, mientras que la plasticidad es la desviación de dicha trayectoria con respecto a una recta paralela al eje de las abscisas (Naya, 2010).

Durante mucho tiempo se consideró el efecto del ambiente sobre la expresión fenotípica como “ruido” en el estudio del proceso de selección de genes (Pigliucci, 1996). Si bien la plasticidad fenotípica es un fenómeno que ocurre a escala ecológica, garantizando la adaptación de los individuos a ambientes heterogéneos, sus consecuencias evolutivas pueden ser significativas al modular la selección natural. Por ejemplo, la adecuación causada por la plasticidad fenotípica podría determinar que individuos de genotipos desiguales presentaran fenotipos similares, lo que limitaría la posibilidad de selección y, por tanto, contribuiría a mantener la variabilidad genética dentro de una población (Gianoli, 2004). Organismos cuyo ambiente es muy cambiante o que pueden desarrollarse, por ejemplo, tanto en ambientes temporales como permanentes o a temperaturas de invierno y verano, requieren de un mecanismo que les permita una adaptación rápida a dicho ambiente. Es decir, en ciertos casos es más beneficioso poseer la capacidad de ser altamente plástico a nivel individual, que evolucionar hacia un genotipo que implique la dominancia de un fenotipo frente a otros en un ambiente dado. Mientras estos individuos exhiban plasticidad fenotípica la selección natural no podrá discriminar entre ellos y por tanto el fenómeno será estable en términos evolutivos.

Muchas de las observaciones sobre la plasticidad fenotípica han sido realizadas en organismos acuáticos, en particular en aquellos que presentan ciclos de vida complejos. Para el caso particular de los animales, se ha comprobado que la plasticidad en el crecimiento y el desarrollo puede influenciar el tiempo y el tamaño a la metamorfosis en insectos, crustáceos, peces y anfibios (Jara, 2010; Relyea, 2007). El estudio de la plasticidad fenotípica en la etapa larval es particularmente importante

porque no sólo lleva al individuo a adecuarse al ambiente acuático sino que además lo condiciona en su fase terrestre (Bridges, 2002; Relyea & Hoverman, 2003). Es decir, el fenotipo inducido llevará a cambios en, por ejemplo, la probabilidad de supervivencia del individuo como juvenil.

2.2 Plasticidad fenotípica en larvas de anuros

Las larvas de anfibios anuros han sido ampliamente utilizadas como modelo de estudio para evidenciar la plasticidad fenotípica (Miner et al., 2005). La fase larval en estos individuos presenta un amplio rango de duración, desde poco más de un mes hasta años en algunas especies (Alford, 1999). Las larvas de anfibios exhiben una considerable plasticidad fenotípica, existiendo estudios que indican que responden, entre otros factores, a la duración del hidroperíodo (Laurila & Kujasalo, 1999; Bridges, 2002; Laurila et al., 2002; Loman & Claesson, 2003; Lind & Johansson, 2007; Jara, 2010), a la competencia (Kehr, 1989; Bridges, 2002; Relyea & Hoverman, 2003; Relyea & Auld, 2004) y a la presión de depredación (Laurila & Kujasalo, 1999; Bridges, 2002; Relyea, 2002a; Relyea & Hoverman, 2003; Relyea & Auld, 2004; Relyea, 2007; Jara, 2010). Para el caso particular de la competencia, se han realizado varios estudios utilizando la disponibilidad de recursos como variable indicadora de la misma (Relyea, 2002b). En algunos casos se encontró que este factor tiene un efecto, a nivel morfológico, antagónico al ocasionado por la depredación. Los depredadores inducen colas relativamente más grandes y cuerpos más pequeños (Miner et al., 2005), mientras que la competencia induce colas relativamente cortas y cuerpos largos, reduciendo el crecimiento larval y el desarrollo (Relyea & Hoverman, 2003). Además, existe amplia evidencia de que altas densidades (alta competencia) y bajos niveles de alimento reducen la masa a la metamorfosis, el largo absoluto y la tasa de desarrollo en larvas de anuros (Crump, 1981; Kehr, 1989). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre plasticidad fenotípica en anfibios se basan en pocos géneros de algunas familias distribuidas en el hemisferio norte y centro América (Jara, 2010).

2.3 Plasticidad fenotípica en el tracto digestivo

El sistema digestivo posee dos características que determinan que sea un buen modelo para el estudio de la plasticidad fenotípica. Por un lado, representa la interfase más activa en cuanto al flujo de energía y nutrientes entre el organismo y el ambiente. Esto significa que el tracto digestivo es el vínculo funcional entre la energía ingerida y la energía metabolizable, es decir, la energía con que cuenta un organismo para

cumplir con todas sus funciones vitales (Secor, 2001). Por tanto, sistemas digestivos de gran tamaño asegurarían una elevada capacidad funcional por lo que deberían ser beneficiosos. Por otro lado, el tracto digestivo está compuesto por un tejido muy activo en términos metabólicos, lo que significa que su mantenimiento implica un elevado costo tanto en términos de consumo de energía como de proteínas (Cant et al., 1996). Por tanto, el compromiso entre las ventajas y los costos asociados a un sistema digestivo con una determinada capacidad funcional, hace esperable que los organismos ajusten finamente sus rasgos digestivos acompañando los cambios en las condiciones externas (e.g., disponibilidad de alimento, calidad del alimento disponible) y en sus demandas energéticas internas (e.g., termorregulación, reproducción). En línea con lo anterior, estudios desarrollados durante el último siglo, y en particular durante las últimas décadas, demuestran claramente que la morfometría del intestino exhibe una marcada flexibilidad al cambiar las condiciones ambientales (Naya, 2008; Naya et al., 2008), existiendo evidencia de esto para todos los grupos de vertebrados (Penisi, 2005). Los factores causantes de los cambios digestivos más estudiados han sido la cantidad y calidad del alimento, la temperatura ambiental y el estatus reproductivo (Naya, 2008). Para el caso particular de la disponibilidad de alimento, tanto modelos teóricos (e.g., Sibly, 1981) como trabajos empíricos (e.g., Naya et al., 2005; Secor & Diamond, 1998; Starck et al., 2007; Naya, 2008) han demostrado que ocurre una disminución en las dimensiones del tracto digestivo concomitantemente con una disminución de la disponibilidad de alimento. Sin embargo, el único trabajo existente a la fecha que ha evaluado la relación entre las dimensiones del tracto digestivo y la disponibilidad de alimento en larvas de anfibios, ha reportado el patrón inverso al arriba mencionado (Relyea & Auld, 2004). Sin duda, son necesarios más estudios destinados a determinar si estamos frente a un caso particular o si existe alguna razón para que las larvas de anfibios se alejen del patrón observado para el resto de los vertebrados en este respecto.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo general

Analizar el efecto de la disponibilidad de alimento sobre la sobrevivencia, la tasa de desarrollo, el tamaño corporal, la forma del cuerpo y la morfometría digestiva en larvas de *H. pulchellus*.

3.2 Hipótesis y predicciones

- (1) Dada la necesidad de energía y nutrientes para el desarrollo y el crecimiento, es esperable que la cantidad de alimento disponible afecte tanto a la tasa de desarrollo como al tamaño corporal. En particular, se predicen tres situaciones posibles: (i) al incrementarse la disponibilidad de alimento ocurre una aceleración en el desarrollo, pero no hay cambios en el tamaño corporal (para cada estadio dado); (ii) al incrementarse la disponibilidad de alimento no ocurre una aceleración del desarrollo, pero sí un incremento del tamaño corporal; (iii) al incrementarse la disponibilidad de alimento ocurre una aceleración en el desarrollo así como también un incremento en el tamaño corporal para cada estadio dado.
- (2) Dado que el sistema digestivo es el sistema que permite el aprovechamiento del alimento, es esperable una correlación positiva entre la disponibilidad de alimento y el tamaño del tracto digestivo. Por tanto, se predice que al aumentar la disponibilidad de alimento aumentan el largo y la masa del tracto digestivo (expresados en términos masa específicos).
- (3) Dado que el sistema digestivo constituye la mayor parte del volumen corporal de las larvas de anuros, es esperable que cambios en el sistema digestivo afecten la relación entre el tamaño del cuerpo y el tamaño total. En particular, se predice que la relación largo del cuerpo / largo total se incrementa en paralelo a la disponibilidad de alimento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelo de estudio

Para el presente estudio se tomó como modelo a *Hypsiboas pulchellus*. Esta especie resultó ideal para el trabajo ya que presenta amplia distribución en Uruguay, habitando tanto en cuerpos de agua temporales como permanentes (Achaval & Olmos, 2003), se reproduce durante todo el año y existe una clara descripción de su larva (Gallardo, 1961). Además, presenta una amplia variación local, tanto en adultos como en larvas (Langone, 1995). *H. pulchellus* deposita sus huevos inmersos en una masa gelatinosa adherida a la vegetación sumergida. Las larvas son bentónicas, poseen un importante tamaño relativo, gran variación en la coloración y son fácilmente identificables debido a que poseen una línea entrecortada situada por encima de los músculos de la aleta dorsal y un hocico particular, retraído hacia el plano ventral. Otro factor que hace a esta especie especialmente adecuada es que su mantenimiento en condiciones de

laboratorio ha demostrado ser relativamente sencillo y responde plásticamente, en cuanto al crecimiento frente a distintas condiciones experimentales (Kehr, 1987).

4.2 Diseño experimental

A finales de julio de 2009, se colectó una puesta de *H. pulchellus*, en la localidad de Barra Grande, Rocha. La misma fue llevada al acuario de la Facultad de Ciencias y mantenida hasta el momento de comenzar el experimento. Luego de 72 horas de eclosionadas las larvas (13 de agosto de 2009) se tomaron 50 individuos para su utilización en el experimento. Se establecieron 10 tratamientos experimentales (con 5 replicas cada uno), con los siguientes niveles de alimento: 0,5, 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25 y 30 mg de comida estándar para peces (Hikari®) adicionados cada tres días. Todos los individuos fueron mantenidos en peceras individuales de 2 litros de capacidad, a temperatura (20°C) y fotoperíodo (12D:12L) constantes. Cada 3 días se alimentó de acuerdo a las condiciones establecidas y, con el fin de reducir la contaminación (Laufer & Maneyro, 2008), se realizó también el cambio del 25% del agua (0,5 litros) de cada pecera. Los días 14 y 28 del experimento se realizó el cambio del 90% del agua de cada pecera. El experimento fue finalizado el día 39 (correspondiente al 20 de setiembre de 2009), tiempo medio en alcanzar el estado de metamorfo (estadios Gosner entre 41 y 46; Gosner, 1960) para *H. pulchellus* en primavera (Kehr & Basso, 1992). Al finalizar el experimento las larvas fueron anestesiadas (en dilución de alcohol) y para cada individuo se tomaron los siguientes datos: dos fotografías digitales (vista lateral y vista dorsal, Fig. 1), masa corporal y estadio de desarrollo, según Gosner (1960). Luego de sacrificadas, las larvas fueron disecadas y se determinó: el largo del intestino, la masa del intestino (peso húmedo con y sin contenido y peso seco) y la masa de la carcasa (peso húmedo y peso seco). A partir de las fotografías se determinó el largo del cuerpo y el largo total del individuo, así como también las medidas necesarias para calcular el volumen total del individuo. Para determinar dicho volumen la cola fue tomada como un cono de base elíptica, cuyos diámetros los representaron el alto y el ancho del músculo de la cola, y la altura correspondió al largo total de la cola; el volumen del cuerpo se calculó como el de un cuerpo elíptico, considerando el largo, el ancho y el alto del cuerpo como diámetros para el cálculo. La forma del cuerpo se estimó como la relación entre el largo del cuerpo y el largo total de cada individuo.



Figura 1. Fotografías digitales de un ejemplar de *H. pulchellus*. A: vista lateral; B: vista dorsal.

4.3 Análisis de datos

La relación entre las distintas variables de respuesta y la disponibilidad de alimento (tomada como mg d^{-1}) fue analizada separadamente a partir de un análisis de correlación producto momento de Pearson. Con el fin de probar si existe una relación entre la supervivencia y la disponibilidad de alimento, se realizó una regresión logística binaria entre dichas variables. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de vías. Dicho análisis permite establecer, en base a regresiones lineales, las relaciones de causalidad directa e indirecta o de independencia entre las variables (Shipley, 2000).

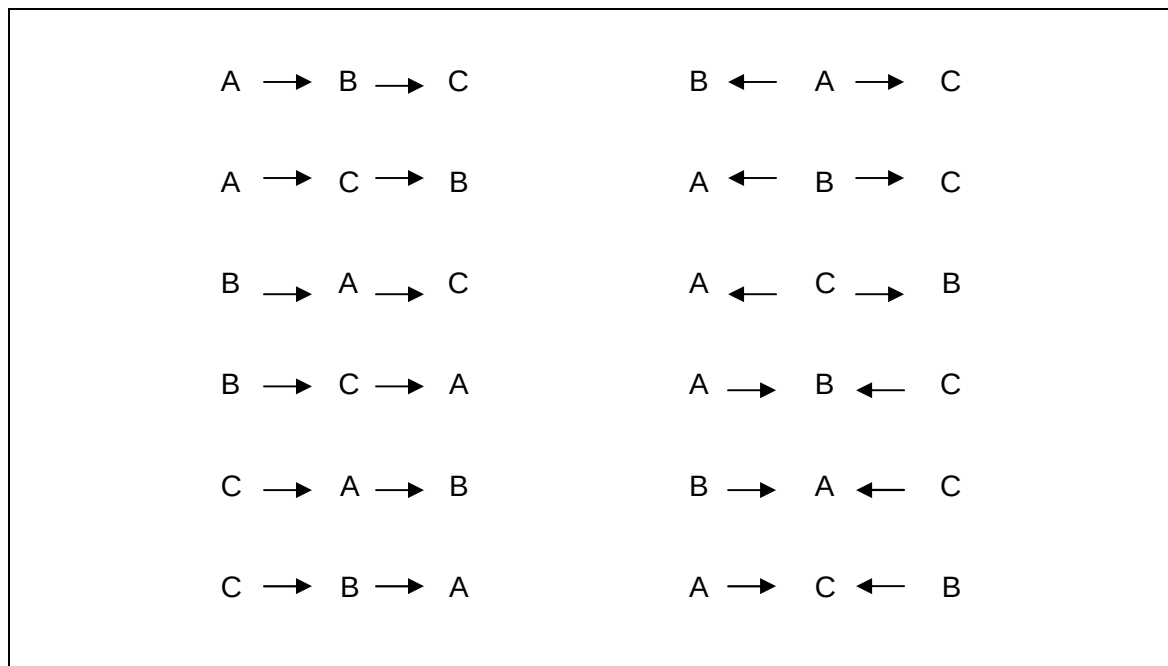


Figura 2. Todas las posibles relaciones causales entre tres factores, considerando solo dos pasos. Las flechas indican relaciones de causalidad entre variables.

Por ejemplo, una relación de causalidad $A \rightarrow B \rightarrow C$, significa que A condiciona a B y a C, a B de forma directa y a C indirectamente (a través de B); C no condiciona ningún factor y por ello se denomina variable “off”. Más en general, en la figura 2 pueden verse todas las relaciones causales posibles entre tres variables, utilizando solo dos pasos. El análisis de vías permite pues establecer, adjudicando probabilidades a cada modelo, cuál de todas las posibles situaciones es la que más se ajusta a los datos obtenidos.

Para los análisis de vías se consideraron todas las variables abarcadas por las hipótesis de trabajo, esto es: disponibilidad de alimento, masa corporal, estadio de desarrollo, forma del cuerpo y masa del intestino. Estas variables fueron relacionadas de a tres, de a cuatro y de a cinco (ver resultados), con el fin de establecer y verificar que relaciones contaban con mayor significancia estadística.

Finalmente, se realizaron regresiones no lineales (cuadráticas) entre la disponibilidad de alimento y las variables dependientes que no fueron afectadas directamente por dicho factor, controlándose el efecto directo de las variables intermedias entre ambas. Es decir, primero se calcularon los residuos entre las variables no afectadas directamente por la disponibilidad de alimento y la variable dependiente que la determina de forma directa (según el análisis de vías), y estos residuos fueron evaluados, a través de una correlación cuadrática, con la disponibilidad de alimento. La finalidad de estos análisis fue evidenciar posibles efectos directos no lineales de la disponibilidad de alimento sobre las variables de respuesta, más allá de los efectos producidos a través de las variables directamente correlacionadas (evidenciados por el análisis de vías).

El error tipo I admitido en todos los análisis fue del 5%. Todos los análisis realizados fueron llevados a cabo utilizando el programa Statistica® (Statsoft, Tulsa, OK, USA) versión 6.0 para Windows® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

5. RESULTADOS

Los individuos provenientes de los tratamientos de 0,5 y 2,0 mg (0,17 y 0,67 mg.d⁻¹, respectivamente), culminaron el experimento con masas muy bajas, que caían dentro del límite de detección de la balanza empleada para su determinación. Por tal motivo, esos individuos fueron excluidos del análisis de datos. El mismo se realizó entonces utilizando los datos provenientes de los restantes 8 tratamientos. Los individuos que

sobrevivieron al experimento fueron 39 (de 50), de los cuales 32 (de 40) pertenecían a los tratamientos incluidos en el análisis.

5.1 Efecto de la disponibilidad de alimento sobre la supervivencia, desarrollo, tamaño, morfología corporal e intestinal

La mortalidad se distribuyó de forma homogénea a lo largo de los tratamientos (Fig. 3). Todas las variables de respuesta medidas o determinadas en el experimento (estadio de desarrollo, masa corporal, largo total, largo del cuerpo, volumen total, volumen del cuerpo, masa y largo del intestino) resultaron estar positivamente correlacionadas con la disponibilidad de alimento (Fig. 4).

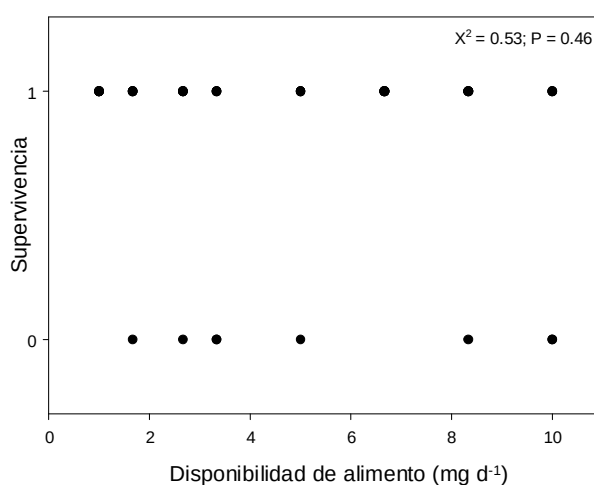


Figura 3. Regresión logística binaria de la supervivencia (1) o muerte (0) en función de la disponibilidad de alimento.

5.2 Análisis de las relaciones causales entre variables

Cuando las variables fueron tomadas de a tres (dejando fija la disponibilidad de alimento y variando otras dos variables de respuesta), permitiéndose sólo dos conexiones, se observó que los modelos que mejor se ajustan a los datos son los siguientes (Fig. 5): (1) Al relacionar la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo y la masa corporal, se obtuvo que la disponibilidad de alimento determina la masa corporal, la cual a su vez determina el desarrollo ($p = 0,93$). (2) Al relacionar la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo y la forma del cuerpo se obtuvo que la disponibilidad de alimento condiciona el desarrollo, el cual condiciona la forma corporal ($p = 0,45$). (3) Al relacionar la disponibilidad de alimento, el tamaño corporal y la forma de cuerpo, se obtuvieron dos modelos con buen ajuste: la disponibilidad de alimento condiciona independientemente a la

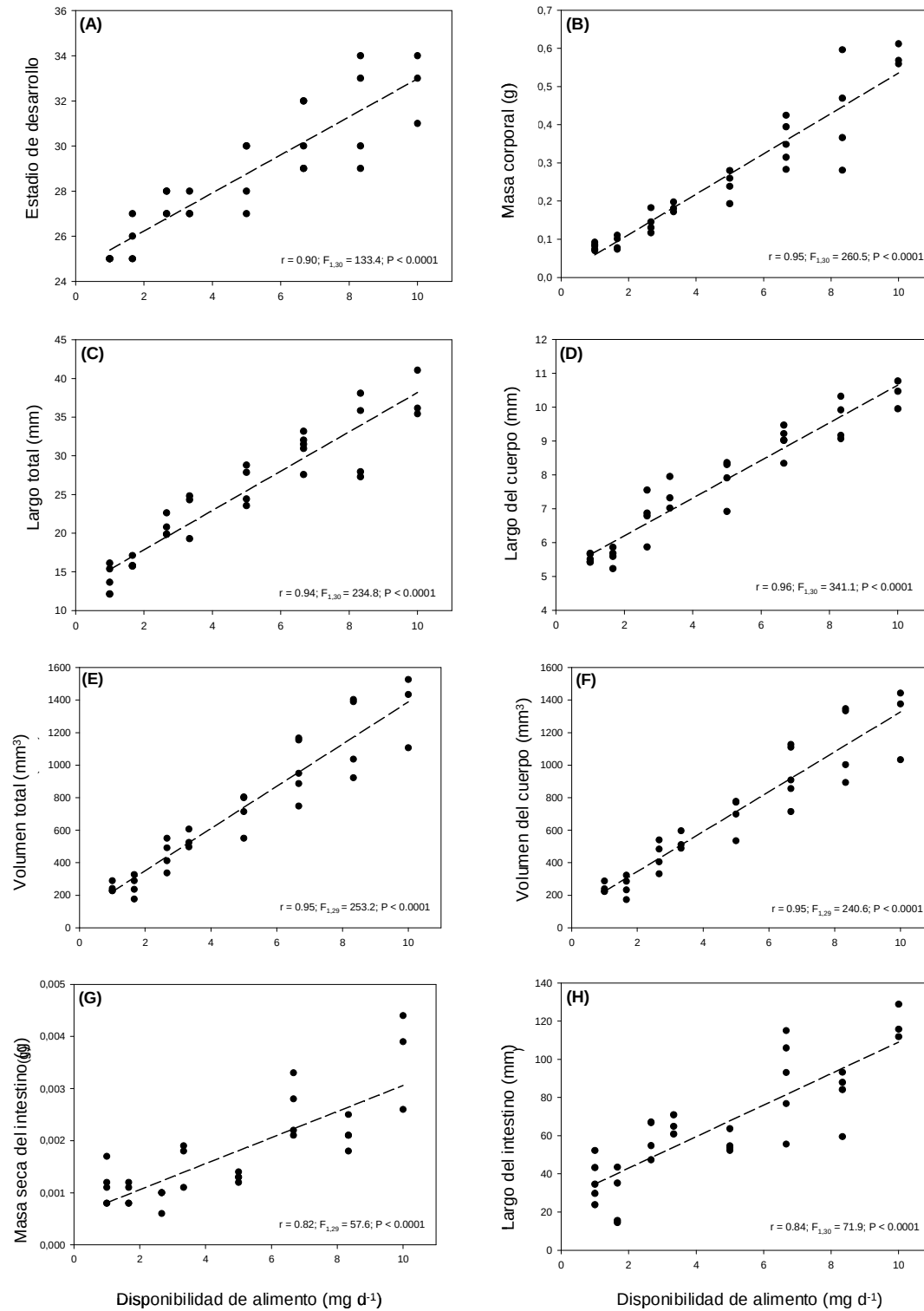


Figura 4. Correlación entre cada variable de respuesta y la disponibilidad de alimento. A: estadio de desarrollo; B: masa corporal; C: largo total; D: largo del cuerpo; E: volumen total; F: volumen del cuerpo; G: masa del intestino; H: largo del intestino.

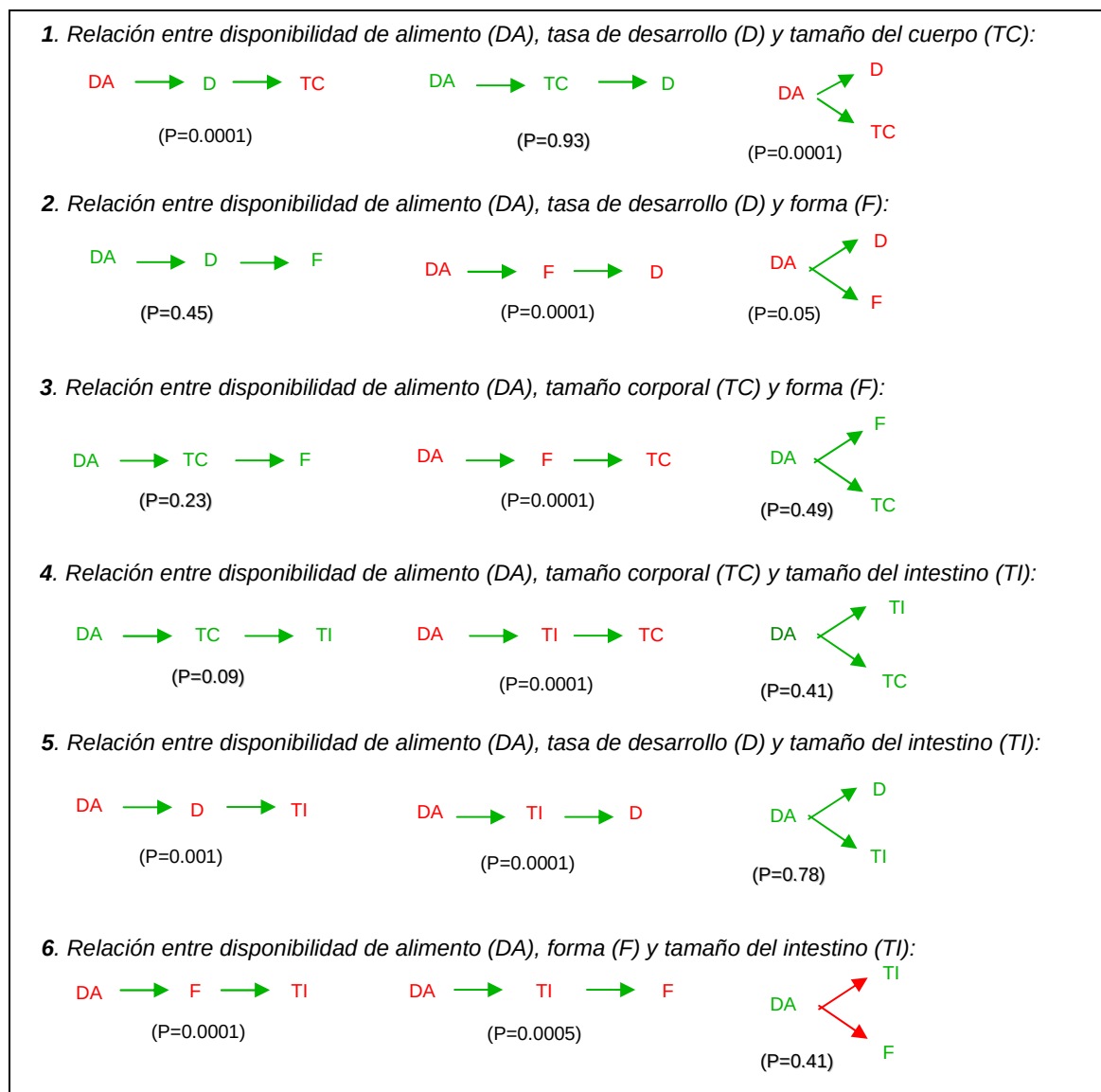


Figura 5. Modelos de vías considerando la disponibilidad de alimento y dos variables de respuesta. En letras verdes se representan los modelos que poseen buen ajuste a los datos y con flechas verdes se indican las vías que son significativas.

masa corporal y a la forma ($p = 0,49$) o la disponibilidad de alimento condiciona la masa corporal y ésta a la forma ($p = 0,23$). (4) Al relacionar la disponibilidad de alimento, la masa corporal y la masa del intestino también se observó que dos modelos ajustaban bien a los datos: la disponibilidad de alimento condiciona independientemente a las otras dos variables ($p = 0,41$) o la disponibilidad de alimento determina la masa corporal y esta a la masa del intestino ($p = 0,09$). (5) Al relacionar la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo y la masa del intestino se obtuvo que la disponibilidad de alimento determina en forma

independiente a las otras dos variables ($p = 0,78$). (6) Finalmente, al relacionar la disponibilidad de alimento, la forma del individuo y la masa intestinal, el modelo que mejor se ajusta a los datos indica que la disponibilidad de alimento condiciona en forma independiente tanto a la forma corporal como a la masa del intestino ($p = 0,41$). Entonces, tomando todos los modelos de forma conjunta, parece ser que el tamaño corporal afecta la tasa de desarrollo, la cual, a su vez, afecta la forma del cuerpo. El tamaño corporal puede o no afectar la forma del cuerpo y el tamaño del tracto digestivo, el cual, a su vez, no es afectado ni por la tasa de desarrollo ni por la forma del cuerpo.

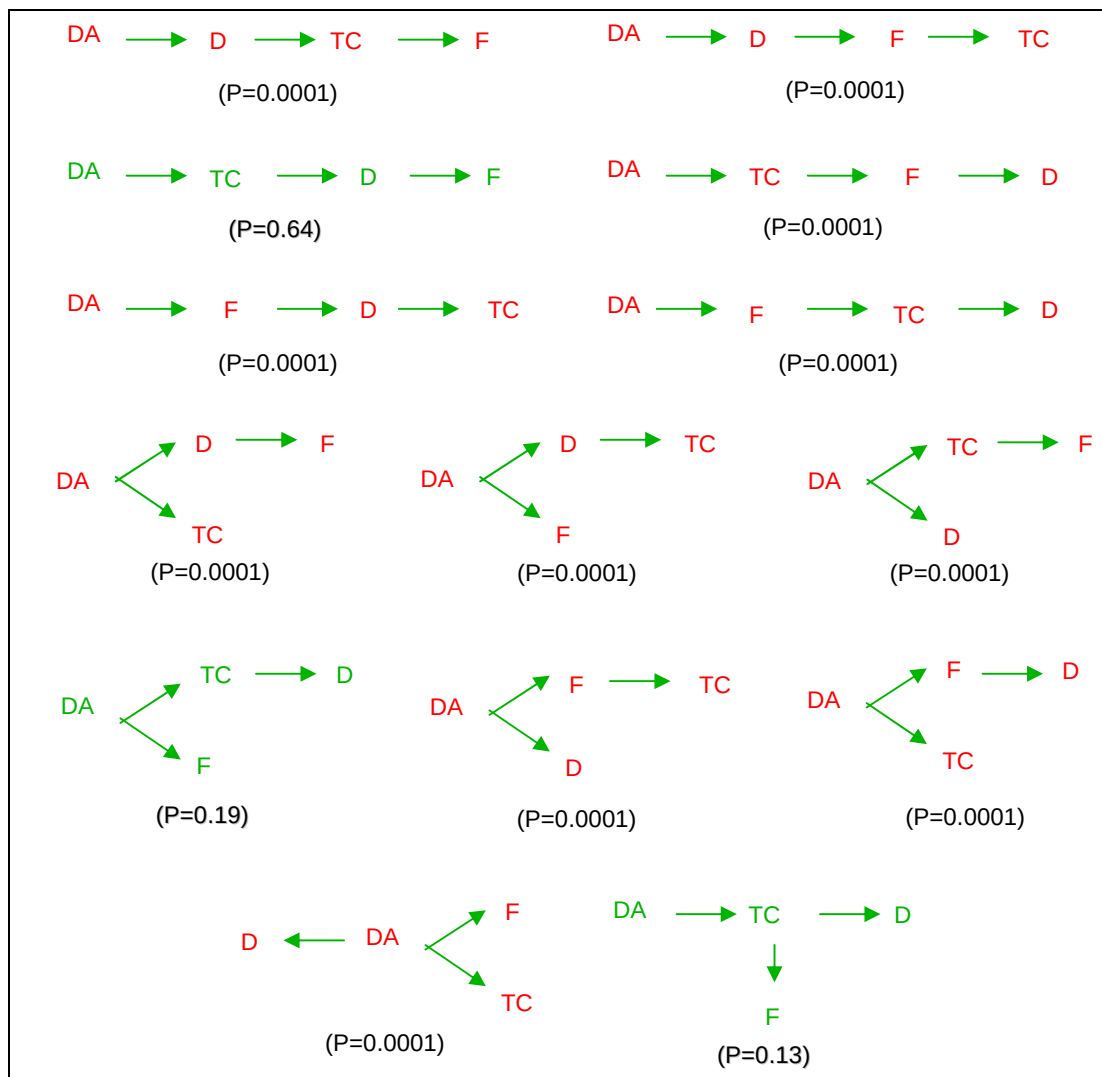


Figura 6. Modelos de vías considerando la disponibilidad de alimento (DA), la tasa de desarrollo (D), el tamaño corporal (TC) y la forma corporal (F). En letras verdes se representan los modelos que poseen buen ajuste a los datos y con flechas verdes se indican las vías que son significativas.

Cuando las variables fueron tomadas de a cuatro (dejando fija la disponibilidad de alimento y variando otras tres variables de respuesta), permitiéndose sólo tres conexiones, se observó que los modelos que mejor se ajustan a los datos son los siguientes: (1) Al relacionar la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo, la masa corporal, y la forma del cuerpo se obtuvieron tres modelos con buen ajuste a los datos (Fig. 6): (i) la disponibilidad de alimento determina la masa corporal, la que a su vez determina el desarrollo; la forma corporal es determinada por la tasa de desarrollo ($p = 0,64$); (ii) la disponibilidad de alimento determina la masa corporal, la que a su vez determina el desarrollo; la forma del cuerpo es determinada sólo por la disponibilidad de alimento ($p = 0,19$); (iii) la disponibilidad de alimento condiciona a la masa corporal, quien condiciona de forma independiente al estadio de desarrollo y a la forma del cuerpo ($p = 0,13$). (2) Al relacionar la disponibilidad de alimento, el estadio de desarrollo, la masa corporal, y la masa del intestino se obtuvieron dos modelos con buen ajuste a los datos (Fig. 7): (i) la disponibilidad de alimento condiciona la masa corporal y la masa del intestino en forma independiente, al mismo tiempo que la masa corporal condiciona el estadio de desarrollo ($p = 0,40$); (ii) la disponibilidad de alimento condiciona la masa corporal y ésta, a su vez, condiciona de forma independiente al estadio de desarrollo y a la masa intestinal ($p = 0,19$). Cuando se toman conjuntamente estos resultados, los datos vuelven a sugerir que la disponibilidad de alimento afecta el tamaño corporal, el que a su vez afecta la tasa de desarrollo, y ésta última a la forma del cuerpo. La masa intestinal probablemente sea afectada directamente por la disponibilidad de alimento, pero un efecto indirecto a través del tamaño corporal no puede ser descartado.

Finalmente, se evaluó el ajuste de distintos modelos con todas las variables, permitiendo cuatro conexiones entre ellas, destinados principalmente a resolver las ambigüedades existentes en los modelos previos. En este caso se observó que los modelos que mejor se ajustan a los datos son (Fig. 8): (i) la disponibilidad de alimento condiciona de forma independiente a la masa corporal y la masa del intestino; la masa corporal condiciona a la tasa de desarrollo y ésta última a la forma ($p = 0,40$); (ii) la disponibilidad de alimento condiciona a la masa corporal, quien condiciona de manera independiente a la masa del intestino y a la tasa de desarrollo; esta última variable condiciona a la forma ($p = 0,20$); (iii) la disponibilidad de alimento condiciona independientemente a la masa corporal, a la forma y a la masa intestinal, mientras que la masa corporal determina la tasa de desarrollo ($p = 0,16$).

Entonces, considerando conjuntamente todos los análisis realizados hasta aquí, se acepta que la relación de causalidad más probable es la siguiente: la

disponibilidad de alimento condiciona la masa corporal; la masa corporal condiciona la tasa de desarrollo; el estadio de desarrollo condiciona a la forma corporal; y finalmente, la masa del intestino viene dada por la disponibilidad de alimento de forma independiente a los otros rasgos. De acuerdo con esto, cuando estas variables son analizadas de forma pareada se observa que existe una fuerte correlación entre ellas. En particular, se observa que la disponibilidad de alimento se correlaciona positivamente con la masa corporal y con la masa del intestino, la masa corporal se

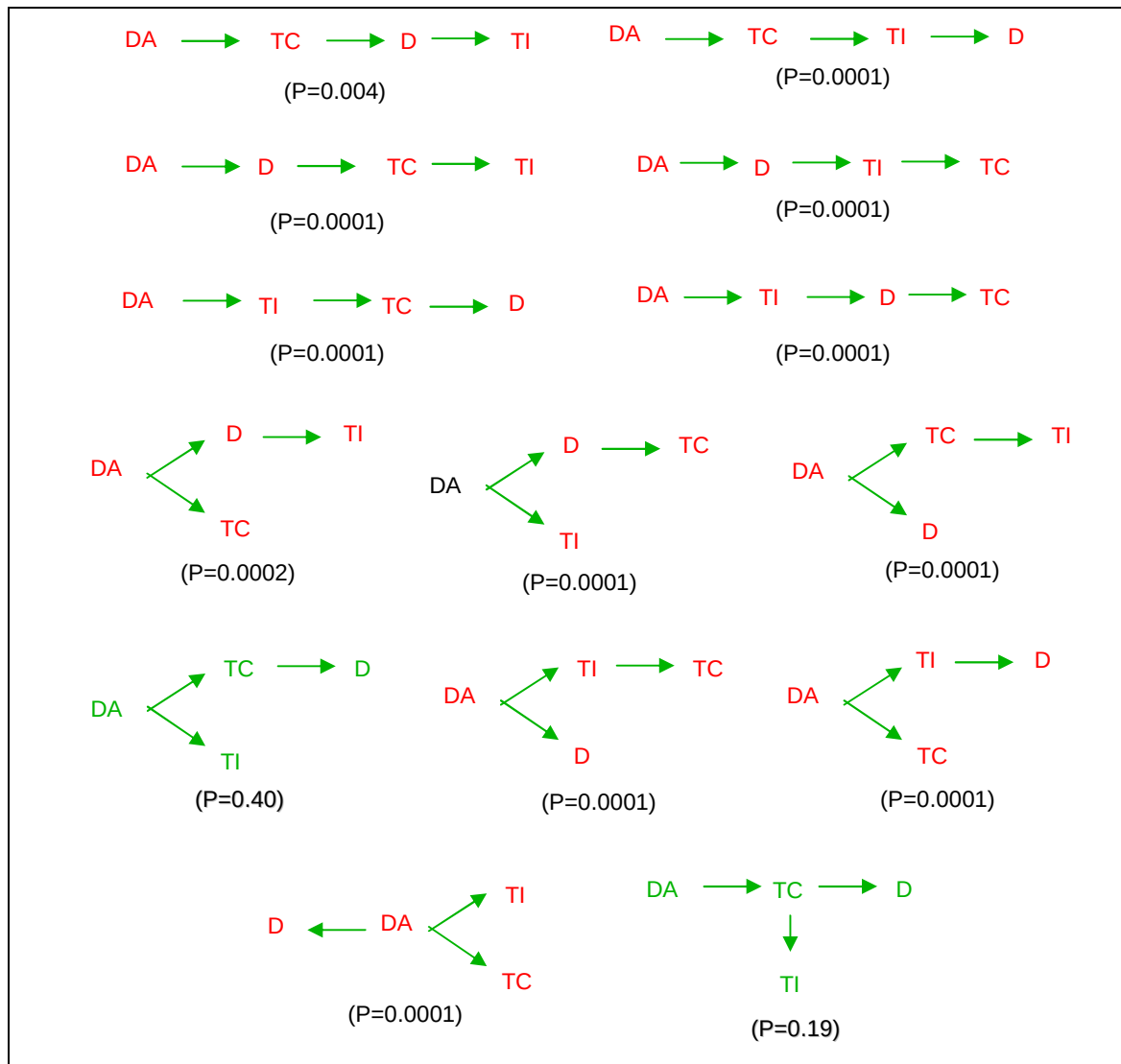


Figura 7. Modelos de vías considerando la disponibilidad de alimento (DA), la tasa de desarrollo (D), el tamaño corporal (TC) y el tamaño intestinal (TI). En letras verdes se representan los modelos que poseen buen ajuste a los datos y con flechas verdes se indican las vías que son significativas.

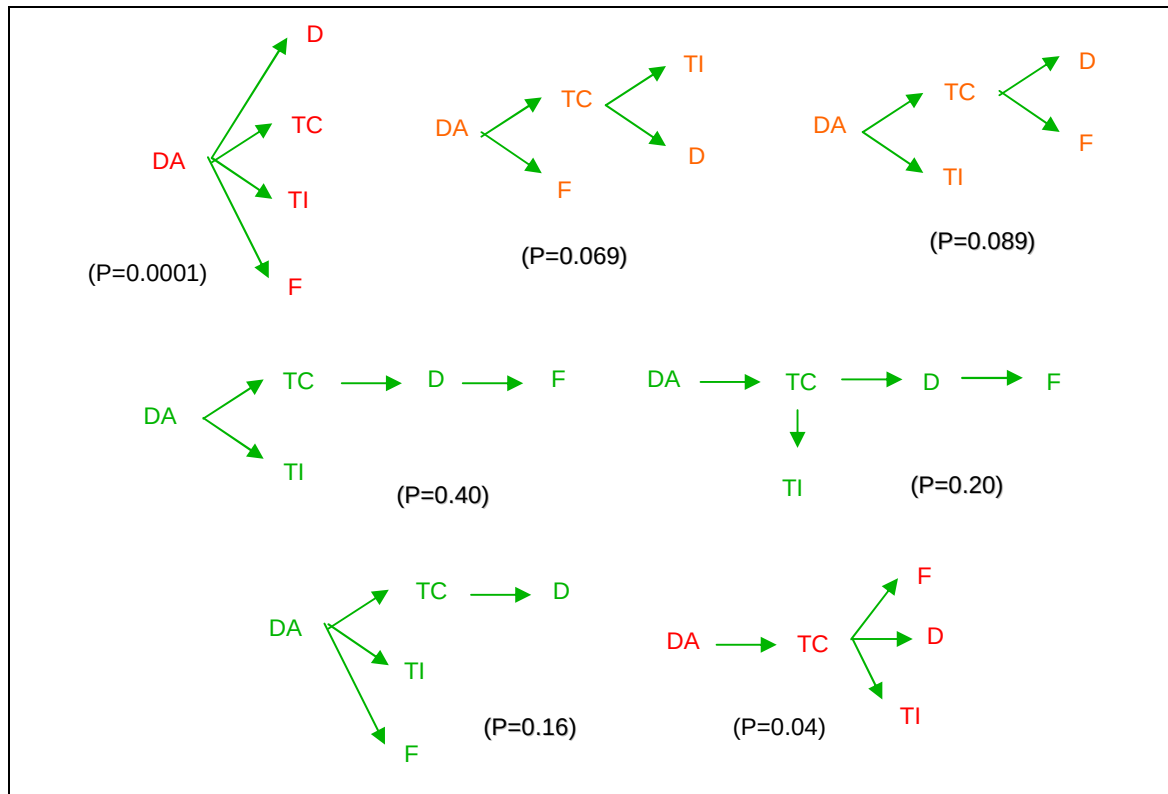


Figura 8. Modelos de vías considerando la disponibilidad de alimento (DA), la tasa de desarrollo (D), el tamaño corporal (TC), la forma corporal (F) y el tamaño intestinal (TI). En letras verdes se representan los modelos que poseen buen ajuste a los datos y con flechas verdes se indican las vías que son significativas. En letras anaranjadas se representan los modelos con ajustes marginales ($0,05 < P < 0,1$).

relaciona positivamente con la tasa de desarrollo y, finalmente, la forma del cuerpo (i.e., relación largo del cuerpo / largo total) se correlaciona negativamente con el estadio de desarrollo (Fig. 9A-D).

5.3. Efectos no lineales de la disponibilidad de alimento

Los análisis de correlación cuadrática entre variables indican que (Fig. 9E-F): (1) existe una relación (convexa) significativa entre la disponibilidad de alimento y el estadio de desarrollo (considerado como los residuos con respecto a su principal determinante, i.e., el tamaño corporal) y (2) existe una relación (cóncava) marginalmente significativa entre la disponibilidad de alimento y la forma del cuerpo (considerada como los residuos con respecto a su principal determinante, i.e., el estadio de desarrollo).

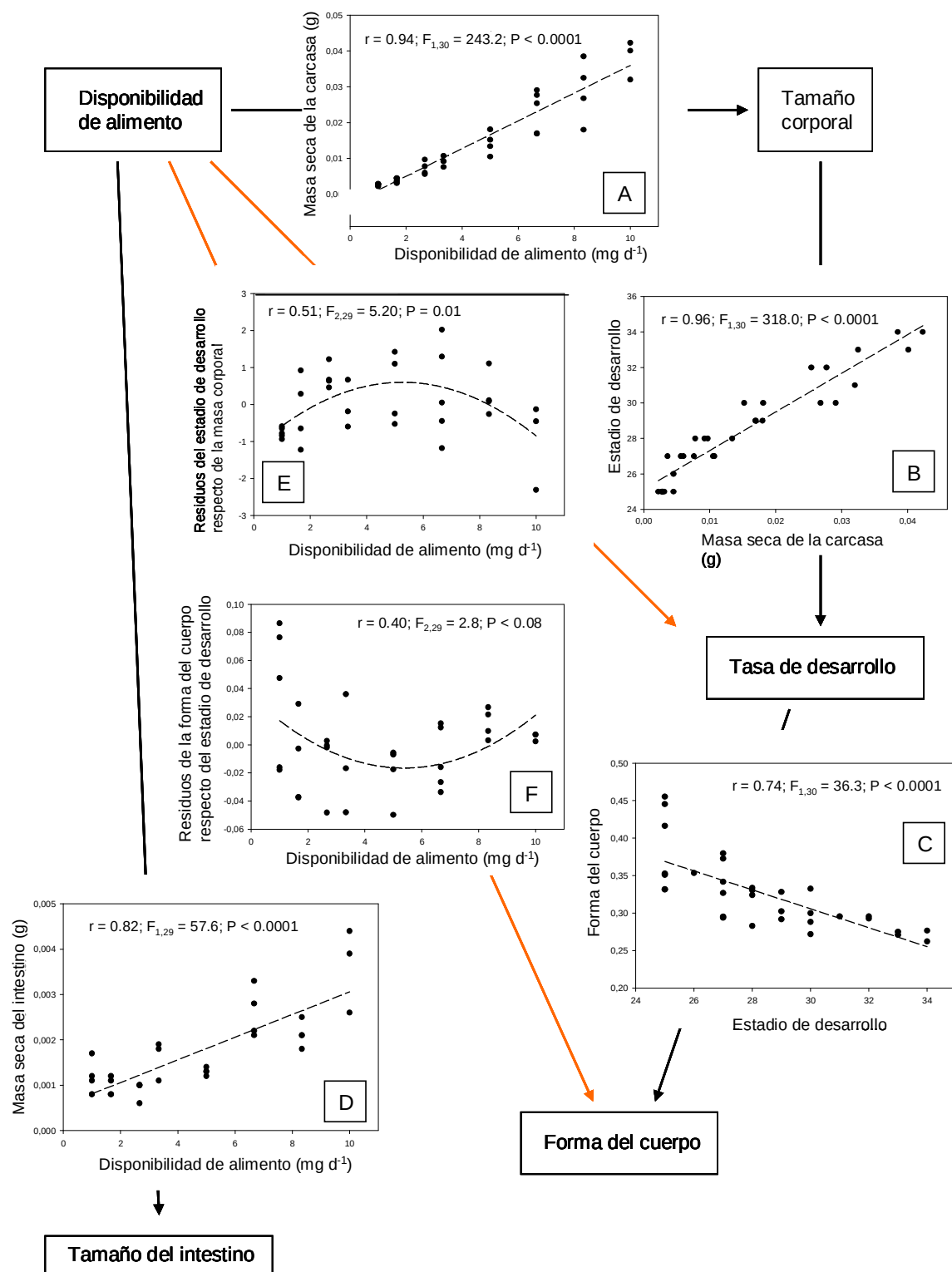


Figura 9. Correlaciones lineales entre: masa seca de la carcasa y disponibilidad de alimento (A); estadio de desarrollo y masa de la carcasa (B); razón largo del cuerpo / largo total (forma) y estadio de desarrollo (C); y masa seca del intestino y disponibilidad de alimento (D). Regresiones cuadráticas entre la disponibilidad de alimento y el estadio de desarrollo (residuos con respecto al tamaño corporal) (E), y entre la disponibilidad de alimento y la forma del cuerpo (residuos con respecto al estadio) (F).

6. DISCUSIÓN

Diversos estudios demuestran la existencia de bases genéticas para las respuestas plásticas (Pigliucci, 2001). Por ello, en el presente trabajo se decidió utilizar individuos procedentes de una única puesta, lo que significa que todos ellos poseían genotipos muy similares. Esta opción metodológica, si bien no permite determinar la relevancia de la variación genética sobre la plasticidad, sí permite determinar el efecto del ambiente sobre las distintas variables fenotípicas consideradas. En este sentido, el efecto del ambiente sobre las variables relacionadas con el desarrollo en larvas de anuros ha sido notado previamente por diversos autores. Por ejemplo, Laugen et al. (2003) encontraron que si bien la tasa de desarrollo está condicionada genéticamente, los efectos ambientales (temperatura y alimentación) pueden anular dicho condicionamiento. Más aun, algunos autores van más allá de lo anterior, proponiendo que la variación en algunos rasgos del desarrollo (e.g., la edad a la metamorfosis) se explica únicamente a través del efecto de factores ambientales (Lesbarrères et al., 2007).

6.1. Efectos de la disponibilidad de alimento sobre la adecuación biológica

El hecho de que todos los rasgos analizados, salvo la mortalidad, fueran afectados por la disponibilidad de alimento indica que las larvas de *H. pulchellus* tienen la capacidad de realizar ajustes fenotípicos a fin de garantizar su sobrevivencia. En este sentido, cabe destacar que en los dos tratamientos no incluidos en el análisis (0,17 y 0,67 mg por día) la mortalidad se distribuyó igual que en los tratamientos que si fueron considerados, es decir, los individuos fueron capaces de sobrevivir aún con cantidades mínimas de alimento. Este hecho pudo deberse a que la calidad del alimento empleado (Hikari®) es mucho mayor que la calidad del alimento que pueden encontrar los individuos en la naturaleza.

Sin embargo, el hecho de que la supervivencia no difiera entre grupos no significa que la adecuación futura de los organismos no sea afectada por la disponibilidad de alimento. En este sentido, cabe mencionar que los distintos atributos relacionados con el desarrollo, que si variaron entre los grupos experimentales, pueden ser relevantes para el desempeño de los organismos, existiendo diversos estudios que indican que los mismos están directamente relacionados con la adecuación biológica de los individuos post-metamórficos. Por ejemplo, Gervasi y Foufopoulos (2008) afirman que individuos metamorfoseados tempranamente muestran una deficiencia en la respuesta inmune frente a un antígeno dado. Ficetola y De Bernardi (2006), por su parte, encontraron un compromiso entre el tiempo de

metamorfosis y el largo de las patas traseras en individuos adultos, al tiempo que Relyea y Hoverman (2003), probaron que la competencia entre larvas produce juveniles de tallas pequeñas con miembros relativamente más cortos. Vale destacar, que el largo de las patas traseras se relaciona directamente con la performance del individuo, ya que afecta la capacidad de saltar, rasgo directamente relacionado con la alimentación y la rapidez de escape frente a depredadores.

6.2. *Evaluación de las hipótesis de partida*

Como hemos dicho anteriormente, todos los rasgos fenotípicos considerados en este estudio –en el cual la variación genética no fue un factor en juego– variaron con los tratamientos experimentales, es decir, respondieron de forma flexible a la disponibilidad de alimento. Específicamente, se observó que a mayor disponibilidad de alimento se obtienen mayor largo, volumen y masa corporal, mayor largo y masa del intestino, y se alcanzan estadios de desarrollo más avanzados en el mismo tiempo. Este resultado puede interpretarse de la siguiente manera: una mayor disponibilidad de alimento determina que los individuos obtengan una mayor cantidad de energía y de nutrientes del medio, lo que les permite desarrollarse más rápido y, por tanto, alcanzar una mayor biomasa, tamaño general y tamaño de las diferentes estructuras. Sin embargo, como veremos a continuación, los resultados encontrados en este trabajo no se ajustan completamente a esta idea.

Con respecto a la primera hipótesis de trabajo, aceptamos la tercer predicción, esto es, una mayor disponibilidad de alimento determinó tanto una aceleración en el desarrollo (i.e., estadios mayores al final del experimento) como un incremento en la masa corporal para un estadio dado. Además, los análisis de vías indican que la masa corporal determina el estadio de desarrollo y no el estadio de desarrollo a la masa corporal. Este hecho podría estar dado por la existencia de un umbral de masa necesario para avanzar al próximo estadio de desarrollo. En este sentido, Wilbur y Collins (1973; en Wells, 2007) proponen una hipótesis según la cual cada especie tiene un tamaño típico mínimo que debe alcanzar antes de que la metamorfosis pueda producirse, así como un tamaño máximo que no puede ser superado en la etapa larval. Estos autores afirman que cuando los recursos son abundantes, las larvas crecen rápidamente y la mayoría de los individuos alcanza el tamaño máximo antes de la transformación. En contraste, cuando los recursos son escasos, tanto el tamaño medio a la metamorfosis como el rango de variación en dicha variable disminuyen, ya que las condiciones desfavorables para el crecimiento, determinan que las larvas se transformen en o cerca del tamaño mínimo. Posteriormente, Day y Rowe (2002) formalizaron la hipótesis de Wilbur y Collins, mediante la construcción de un modelo

matemático, y haciendo referencia no sólo al tamaño a la metamorfosis, sino a umbrales de desarrollo. Estos autores afirman que muchas especies poseen estos umbrales, que definen como un mínimo tamaño o condición que debe ser superado antes de que pueda ocurrir cualquier transición a la siguiente etapa del ciclo vital. Los resultados por nosotros obtenidos –en cuanto a que la masa corporal determina la tasa de desarrollo y no lo contrario– respaldan tanto la hipótesis de Wilbur y Collins (1973) como el modelo de Day y Rowe (2002).

Por otro lado, nuestros resultados también concuerdan con diversos estudios previos. Por ejemplo, Kehr (1989) postula, también para *H. pulchellus*, que al aumentar la disponibilidad de alimento por individuo se incrementa el crecimiento longitudinal de los mismos; este autor asegura que en condiciones de laboratorio, tanto el espacio disponible como la competencia por el alimento son condicionantes del crecimiento longitudinal en larvas de dicha especie. Crump (1981) estudió el tiempo y la talla a la metamorfosis en relación con la densidad de individuos, empleando como modelo a *Hyla crucifer*. Al igual que nosotros, encontró que las altas densidades (i.e., baja disponibilidad de alimento) determinan tiempos de desarrollo mayores y menores tamaños al momento de la metamorfosis. Nuestros resultados concuerdan además con los de LaFiandra y Babbitt (2004) quienes afirman que tratamientos con bajo nivel de alimento resultaron en una reducción en la tasa de desarrollo de las larvas. Sin embargo, es importante notar que también existen estudios que reportan resultados contrapuestos a los arriba mencionados. Por ejemplo, Álvarez y Nicieza (2002) encontraron que la tasa de desarrollo responde a la temperatura ambiental pero no a la disponibilidad de alimento, mientras que Rudolf y Rödel (2007), reportaron que con la disminución de la disponibilidad de alimento ocurre una aceleración de la tasa de desarrollo.

Con respecto a la segunda hipótesis, se observó que, efectivamente, la masa del tracto digestivo se incrementó al aumentar la disponibilidad de alimento. Este resultado concuerda con lo esperado por la teoría de digestión óptima (Sibly, 1981) y con lo encontrado para diversos grupos de vertebrados (Naya et al., 2005; Secor & Diamond, 1998; Strarck et al., 2007; Naya, 2008), al tiempo que es contrario a los resultados obtenidos por Relyea & Auld (2004), único trabajo existente a la fecha para larvas de anuros (Relyea & Auld 2004). En este sentido, Relyea y Auld (2004) observaron que la competencia indujo a desarrollar intestinos relativamente largos, lo que determinó un incremento en el tamaño relativo del cuerpo. A su vez, afirman que mayores largos intestinales permiten a los individuos crecer de forma más eficiente, y por tanto, los renacuajos inducidos por alta competencia tienen una tasa de crecimiento mayor que el fenotipo inducido por baja competencia (Relyea 2002b).

Esta hipótesis, un tanto contra intuitiva, va en contra de los resultados obtenidos en el presente trabajo. En nuestro caso, los individuos que tuvieron menor disponibilidad de alimento mostraron tasas de desarrollo más bajas y presentaron tanto largos del intestino como largos corporales significativamente menores a los presentados por individuos con mayor disponibilidad de alimento.

En referencia a la tercer hipótesis, los cambios en el tamaño del tracto digestivo no se asociaron de la forma predicha a los cambios en la forma de los individuos. Por el contrario, se observó que la relación largo del cuerpo / largo total disminuyó conforme aumentaba la disponibilidad de alimento, mientras que el tamaño del intestino aumento con la disponibilidad de alimento. Una explicación probable para este hecho –a su vez concordante con los resultados obtenidos por el análisis de vías– consiste en que los cambios en la forma asociados al desarrollo ontogénico sean mucho más notorios y relevantes que los cambios en la forma asociados al desarrollo del aparato digestivo. En este sentido, a medida que el desarrollo avanza aumenta el largo de la cola, pasando ésta a constituir el componente principal del largo total. Desde esta perspectiva, nuestros resultados concuerdan con los de Relyea y Hoverman (2003), quienes encontraron que individuos con alto grado de competencia (i.e., baja disponibilidad de alimento) exhibían colas relativamente cortas y cuerpos largos. Finalmente, vale mencionar que para verificar si realmente la morfología intestinal no se relaciona con la morfología externa debería de realizarse un nuevo experimento, empleando una aproximación más certera a la forma del individuo e intentando controlar los cambios en la forma asociados a los cambios ontogénicos (e.g., menos grupos con más individuos cada uno).

6.3. Efectos no lineales de la disponibilidad de alimento

La relación no lineal entre el estadio de desarrollo y la disponibilidad de alimento resultó ajustarse a una función cuadrática convexa. Se puede decir que a disponibilidades de alimento bajas los individuos invierten la poca energía que obtienen del medio en mantenerse y no en desarrollarse, a disponibilidades intermedias se da un óptimo de la relación masa-estadio en donde los individuos tienen el alimento necesario para alcanzar un desarrollo acelerado, y finalmente, a disponibilidades de alimento altas los individuos invierten la energía, que excede la necesaria para el desarrollo, en generar biomasa. En relación a esto último, se pueden postular dos explicaciones posibles para el patrón observado: (i) que el tiempo sea un factor limitante del desarrollo y que por tanto no se pueda acelerar el desarrollo más allá de cierto ritmo, independientemente de la energía disponible; y (ii) que los individuos interpreten la alta disponibilidad de alimento como indicador de que se

hallan en un ambiente favorable (i.e., alta productividad, charcos de larga duración) y que por ello se aboquen a generar una mayor biomasa, a fin de metamorfosear con un tamaño superior (que como se ha dicho antes podría repercutir en un mejor desempeño en la vida adulta).

La relación no lineal entre la forma del cuerpo y la disponibilidad de alimento resultó ajustar a una función cuadrática cóncava. Esto implica que a bajas y altas disponibilidades de alimento el largo corporal constituye la mayor parte del largo total (i.e., la cola se desarrolla poco), mientras que a disponibilidades intermedias el largo corporal es relativamente menor (i.e., la cola se desarrolla más). Una posible explicación es que a bajas disponibilidades de alimento los individuos disminuyan lo más posible la inversión en la cola, empleando la poca energía obtenida en sobrevivir, mientras que a altas disponibilidades de alimento el tamaño de la cola sea el adecuado, pero exista un aumento relativo en tamaño corporal relacionado con un mayor desarrollo del tracto digestivo. A disponibilidades de alimento intermedias se da que la energía disponible es la necesaria para optimizar la tasa de desarrollo, y ocurre que, como parte del desarrollo ontogénico, la cola se desarrolla mucho en relación al cuerpo. No obstante, es importante reconocer que estas ideas deberían ser puestas a prueba en un futuro con un diseño experimental adecuado.

6.4. Consideraciones finales y perspectivas

Como hemos mencionado a lo largo del texto, existen diversos estudios que relacionan cambios en la disponibilidad de alimento con distintas variables asociadas al desarrollo de los individuos. Por tanto, lo innovador de este trabajo es el estudio de relaciones causales entre variables a partir de los análisis de vías. En lo que a nosotros concierne, no existía hasta el momento ningún estudio que evidenciara causalidad entre los distintos atributos morfológicos abordados en diversos estudios. Debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos mediante análisis de vías son relativos, en el sentido en que este análisis sólo relaciona las variables que uno incluye en él. Es decir, puede que una variable evidenciada como causal directa de otra no lo sea, sino que exista otra variable (no incluida en el análisis) que medie entre ambas. Sin embargo, las relaciones obtenidas son totalmente válidas aunque existieran variables involucradas no incluidas (que, vale aclarar, siempre las hay).

Por otro lado, existen algunos estudios que relacionan la tasa de desarrollo y el tamaño a la metamorfosis con la calidad de la dieta. A simple manera de ejemplo, Kupferberg (1997) encontró que la tasa de crecimiento se correlaciona positivamente con el contenido de proteínas en el alimento consumido. Dado que la competencia, además de reducir la cantidad de alimento *per capita*, puede llevar a los individuos a

explotar diferentes recursos (obteniendo dietas de diferente calidad) sería interesante, a futuro, abordar nuevos experimentos (factoriales) que combinen tanto la disponibilidad de alimento como la calidad de los mismos.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo agradecer a CSIC por financiar el proyecto “Plasticidad fenotípica en larvas de *Hypsiboas pulchellus*: un análisis multifactorial de señales”, en el marco del cual se llevó a cabo este trabajo. Agradezco a Gabriel Laufer, por su iniciativa, el enorme apoyo brindado y todas las horas de trabajo dedicadas en favor de este y otros emprendimientos. A Gabriel Perazza y Fernando Larrañaga, por ser mis compañeros en este proyecto. A Marcelo Loureiro, por mediar por nosotros para que se nos otorgara un lugar en el acuario de la Facultad de Ciencias. A Matías Arim, por el apoyo y la confianza. A Daniel Naya, por ayudarnos en la planificación y ejecución de este estudio, por brindarnos todo su apoyo y facilitarnos los medios para realizar el procesamiento final; por aceptarme como pasante y por su enorme interés y dedicación volcados en este trabajo. A Gabriel Perazza, nuevamente, y a Martina Vernassa, por su ayuda para la comprensión de los métodos estadísticos empleados en el análisis de datos. A Walter Norbis, por sus críticas en favor de este estudio. A mi familia y amigos, por acompañarme en todo momento. Y a todos los que de una forma u otra formaron parte de mi carrera de grado. ¡Gracias!

8. REFERENCIAS

- Achaval F, Olmos A (2003) Anfibios y reptiles del Uruguay. 2ª edición, Graphis impresora, Montevideo.
- Alford RA (1999) Ecology. In: Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae (Altig, R, McDiarmid RW, eds), pp: 240-278. University of Chicago Press.
- Álvarez D, Nicieza AG (2002) Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology*, 16, 640–648.
- Begon M, CR Townsend & JL Harper (2006). Ecology. From Individuals to Ecosystems. 4th Ed. Blackwell. Oxford.
- Bridges CM (2002) Tadpoles Balance Foraging and Predator Avoidance: effects of Predation, Pond Drying, and Hunger. *Journal of Herpetology*, 36, 627-634.

- Cant JP, McBride BW, Croom Jr WJ (1996) The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. *Journal of Animal Science*, 74, 2541-2553.
- Crump ML (1981) Energy accumulation and amphibian metamorphosis. *Oecologia*, 49, 167-169.
- Day T, Rowe L (2002) Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life history transitions. *American Naturalist*, 159, 338-350.
- Ficetola GF, De Bernardi F (2006) Trade-off between larval development rate and post-metamorphic traits in the frog *Rana latastei*. *Evolutionary Ecology*, 20, 143-158.
- Gallardo JM (1961) Observaciones biológicas sobre *Hyla raddiana* Fitz., de la provincia de Buenos Aires. *Ciencia e Investigación*, 14, 460-465.
- Gervasi S, Foufopoulos J (2008) Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, 22, 100-108.
- Gianoli E (2004) Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas. EUV Valparaíso, Chile.
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183-190.
- Jara FG (2010). Plasticidad fenotípica en anuros patagónicos de los géneros *Pleurodema* y *Rhinella*: respuestas al hidropériodo y a los depredadores. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.
- Kehr AI (1987) Crecimiento individual en larvas de *Hyla pulchella pulchella* y *Bufo fernandezae* en condiciones controladas de coexistencia y densidad (Amphibia: Anura). *Cuadernos de Herpetología*, 3, 1-6.
- Kehr AI (1989) Factores dependientes de la densidad y su influencia sobre el crecimiento individual de los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Amphibia: Anura). *Limnobiós*, 2, 757-761.
- Kehr AI, Basso N (1992). Consideraciones sobre la estructura de edades, supervivencia y tiempo de metamorfosis en los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Anura: Hylidae). *Actas ICASH*, 41, 125-133.
- Kupferberg SJ (1997) The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist*, 37, 146-159.
- LaFiandra EM, Babbitt KJ (2004) Predator induced phenotypic plasticity in the pinewoods tree frog, *Hyla femoralis*: necessary cues and the cost of development. *Oecologia*, 138, 350-359.

- Langone JA (1995) Ranas y sapos del Uruguay. Reconocimiento y aspectos biológicos. Museo Damaso A. Larrañaga. Intendencia Munic. Montevideo. (5)Ser. Divulgación:1-127.
- Laufer G, Maneyro R (2008) Experimental test of intraspecific competition mechanisms among tadpoles of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Zoological Science*, 25, 286–290.
- Laugen AT, Laurila A, Räsänen K, Merilä J (2003) Latitudinal countergradient variation in the common frog *Rana temporaria* developmental rates – evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 996–1005.
- Laurila A, Kujasalo J (1999) Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Journal of Animal Ecology*, 68,1123–1132.
- Laurila A, Karttunen S, Merila J (2002) Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution*, 56, 617-627.
- Lesbarrères D, Schmeller DS, Primmer CR, Merilä J (2007) Genetic variability predicts common frog (*Rana temporaria*) size at metamorphosis in the wild. *Heredity*, 99, 41–46.
- Lind MI, Johansson F (2007) The degree of adaptative phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 1288-1297.
- Loman J, Claesson D (2003) Plastic response to pond drying in tadpoles *Rana temporaria*: tests of cost models. *Evolutionary Ecology Research*, 5, 179–194.
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK, Relyea RA (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 685-692.
- Naya DE (2008) Gut Size Flexibility in Rodents: what we know, and don't know, after a century of research. *Revista Chilena de Historia Natural*, 81, 615-628.
- Naya DE (2010) La plasticidad fenotípica en el contexto actual de cambio global. En: Darwin en el Sur, ayer y hoy. (eds A. Massarini & E. Hasson). Editorial Centro Cultural Ricardo Rojas, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Naya DE, Bozinovic F, Karasov W (2008) Latitudinal trends in physiological flexibility: testing the climatic variability hypothesis with data on the intestinal length of rodents. *American Naturalist*, 172, E122-E134.
- Naya DE, Farfat G, Mendez M, Bozinovic F, Sabat P (2005) Digestive performance in the Andean toad *Bufo spinulosus*: flexibility or hard-wired physiology? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140A, 165-170.

- Pennisi E (2005) The dynamic gut. *Science*, 307, 1896-1899.
- Pigliucci M (1996) How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 168-173.
- Pigliucci M (2001) Phenotypic Plasticity. Beyond Nature and Nurture. John Hopkins University Press. Baltimore.
- Relyea RA (2002a). Costs of phenotypic plasticity. *American naturalist*, 159, 272-282.
- Relyea RA (2002b) Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues, and connections to predator induced plasticity. *Ecological Monographs*, 72, 523-540.
- Relyea RA (2007) Getting out alive: how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia*, 152, 389–400.
- Relyea RA, Auld JR (2004) Having the guts to compete: how intestinal plasticity explains costs of inducible defences. *Ecology Letters*, 7, 869-875.
- Relyea RA, Hoverman JT (2003) The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile tree frogs. *Oecologia*, 134, 596–604.
- Rudolf VHW, Rödel MO (2007) Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. *Evolutionary Ecology*, 21, 121-142.
- Secor SM (2001) Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128A, 565-577.
- Secor SM, Diamond J (1998) A vertebrate model of extreme physiological regulation. *Nature*, 395, 659-662.
- Shipley B (2000) Cause and Correlation in Biology. A user's guide to path analysis, structural equations and causal inference. Cambridge University Press.
- Sibly RM (1981) Strategies of digestion and defecation. En: Physiological Ecology: an Evolutionary Approach to Resource Use (Towsend CR, Calow P, eds), pp: 109-139. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Starck JM, Cruz-Neto AP, Abe AS (2007) Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). *Journal of Experimental Biology*, 210, 2033-2045.
- Wells KD (2007) The ecology & behavior of amphibians. University of Chicago Press.
- Whitman WD, Agrawal AA (2009) What is phenotypic plasticity and why is it important? En: Phenotypic plasticity of insects (Whitman DW, Ananthakrishnan TN). pp 1-47. Science Publishers, Enfield.