
Evaluación de plasticidad fenotípica en larvas de *Hypsiboas pulchellus* en la localidad de Barra Grande, Rocha.

Autor: Gabriel Perazza.

Estudiante de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo - Uruguay.

Orientadora: Lucia Gutiérrez. Profesora Adjunta del Departamento de Biometría, Estadística y Computación. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo – Uruguay. Garzón 780. Tel: 23549475

Co-Orientador: Daniel E. Naya. Profesor Adjunto de la Sección Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo - Uruguay. Iguá 4225, Piso 6, Ala Norte. Tel.: 5258618(7) Int136.

Lugar de Ejecución: Facultad de Agronomía, Facultad de Ciencias

CONTENIDO

Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
1.1 Plasticidad fenotípica.....	4
1.2 Plasticidad fenotípica en larvas de anuros.....	4
2. Hipótesis, resultados esperados y objetivos.....	7
2.1 Hipótesis.....	7
2.2 Resultados esperados para los factores.....	7
2.3 Resultados esperados para la interacción entre factores.....	8
2.4 Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos.....	11
3.1 Modelo de estudio.....	11
3.2 Muestreo en campo.....	11
3.3 Variables ambientales.....	12
3.4 Variables morfométricas.....	13
3.5 Análisis estadísticos.....	13
4. Resultados.....	16
4.1 Análisis con el total de los individuos.....	16
4.2 Análisis para individuos de un estadio (Gosner 25).....	19
4.3 Análisis comparativo con todos los individuos y solo los del estadio 25.....	24
4.4 Análisis de la variable estadio: regresión logística.....	26
5. Discusión.....	29
5.1 Sobre la hipótesis de partida.....	29
5.2 Sobre la evaluación de cambios en la morfología.....	29
5.3 Sobre la evaluación de cambios en la variable estadio.....	32
5.4 Consideraciones finales.....	33
6. Perspectivas a futuro.....	34
7. Agradecimientos.....	36
8. Referencias.....	36
Anexo.....	43

RESUMEN

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. Ha sido estudiado en varios *taxas*, un ejemplo de esto son los anfibios. Éstos, sobre todo en su fase larval pueden sufrir una gran cantidad de cambios en relativamente poco tiempo lo que los hace un buen modelo para el estudio de la plasticidad. Tradicionalmente se ha trabajado con las larvas utilizando tres factores como los principales causantes de los procesos plásticos: la disponibilidad de alimento (competencia), la depredación y el hidroperíodo. Por otro lado, en los últimos años se ha comenzado a trabajar con larvas de anuros como indicadores de impacto ambiental, por lo que conocer las respuestas plásticas más esperadas resulta importante con el fin de encontrar desviaciones de éstas y así detectar indicios de impactos en el ambiente. *Hypsiboas pulchellus* es un anfibio perteneciente a la familia *Hylidae* típico de esta región, de amplia distribución que resulta un buen modelo para estudios de plasticidad en el Hemisferio Sur. Así surgió como objetivo describir algunos atributos de la plasticidad fenotípica observada en campo en un sistema de charcos temporales en Barra Grande, Rocha, para larvas de *Hypsiboas pulchellus*. Se realizaron muestreos en dicha localidad donde fueron tomadas muestras de larvas de *H. pulchellus* para cada charco, así como las variables ambientales referentes a la disponibilidad de alimento, el hidroperíodo y la densidad de depredadores. De las larvas colectadas fue determinado el estadio y mediante fotografías fueron tomadas medidas de la cola y cuerpo. Estas variables fueron analizadas mediante modelos lineales de regresión, relacionándolas con las variables ambientales. Se encontraron respuestas plásticas para algunas de las variables morfométricas y de desarrollo evaluadas. Existe interacción entre la depredación y la disponibilidad de alimento para las variables asociadas a la cola. Situación ampliamente reportada en la bibliografía, no sólo para anfibios, y que seguramente este involucrada en alguna adaptación al medio en que habitan las larvas (charcos temporales). Conocer este tipo de interacciones y su funcionamiento en los sistemas que habitan las larvas es sumamente importante, por ejemplo a la hora de detectar cambios en respuestas normales. No todas las variables respondieron de la forma esperada u observada en otros estudios demostrando la complejidad de realizar estudios en campo, con gran número de variables que pueden estar involucrados en los procesos en juego. Para estudios futuros sería interesante ampliar el número de variables explicativas a probar con el fin de capturar mayor información de interacciones con otros factores que no han sido tomados en cuenta y podrían tener un papel importante en las diferencias observadas.

Palabras clave: larvas de anfibio, plasticidad fenotípica evaluada en campo, interacción entre depredación, alimento e hidropériodo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 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., 2005; Whitman & Ananthakrishnan, 2009). La forma más común de representar respuestas plásticas es mediante la norma de reacción, la cual se define como la representación de un rasgo fenotípico en respuesta al ambiente para un genotipo dado (Pigliucci, 2001).

La plasticidad fenotípica se ha evidenciado y estudiado en diferentes rasgos fenotípicos –e.g. bioquímicos, morfológicos, fisiológicos, de historia de vida–, a diferentes niveles de organización biológica –desde estudios que consideran individuos de una única población hasta estudios que consideran muchas especies sobre grandes escalas geográficas– y en diferentes grupos taxonómicos, incluyendo bacterias, plantas y animales (Whitman & Ananthakrishnan, 2009). El gran desarrollo de su estudio tiene dos orígenes un tanto diferentes. En primer lugar, y más atrás en el tiempo, se evidenció y comenzó a estudiar la plasticidad en la agricultura. Estas investigaciones fueron motivadas ya que se percibía ruido en los experimentos que se realizaban, donde los rendimientos diferían de lo esperado a causa de respuestas plásticas de los cultivos. Ésta visión de ruido motivó la necesidad de estudiarlo, comprenderlo y evitarlo con el fin de mejorar la experimentación en el área agrícola (Fisher, 1930). Como otro origen del estudio de la plasticidad podemos señalar el estudio de sus características, por su valor intrínseco y para comprender que rol juega la plasticidad en la vida de un organismo. Ambos enfoques, si bien con objetivos diferentes, demuestran la importancia de los fenómenos plásticos (Pigliucci, 2001).

1.2 Plasticidad fenotípica en larvas de anuros

Uno de los tantos modelos donde se ha estudiado la plasticidad fenotípica han sido los anfibios. Éstos, particularmente en su fase larval, son capaces de realizar una gran

cantidad de cambios en relativamente poco tiempo. Por otro lado, los fenómenos plásticos que ocurren durante la vida de la larva determinan en gran medida la viabilidad del adulto (Laurila et al., 2002; Van Buskirk, 2002; Relyea & Hoverman, 2003). Numerosos estudios han evidenciado respuestas plásticas en larvas de anfibios en diferentes condiciones ambientales y para diferentes especies. Sin embargo existen un número mucho más pequeño de estudios en el Hemisferio Sur que en el Hemisferio Norte, limitando muchas veces las conclusiones a modelos que podrían no ser representativos de nuestra región (e.g., Denver, 1997; Ficetola & Bernardi, 2006).

Por otro lado, el estudio de la plasticidad en los últimos años, en el marco del cambio global ha adquirido gran importancia, donde se han relacionado ciertas repuestas plásticas para larvas de anfibios (entre otras taxas) con cambios ambientales causados por el hombre (Relyea, 2003; Relyea et al., 2005). En particular para la región (principalmente Argentina) se han comenzado a realizar estudios que relacionan los efectos antropogénicos con los cambios en el hábitat de los anfibios estudiados. Un ejemplo han sido los estudios del uso de glifosato y su acumulación en los cuerpos de agua donde los anfibios habitan (Lajmanovich et al., 2012). Resulta así de gran importancia conocer las repuestas plásticas normales para detectar anomalías en las respuestas de los anfibios (Junges et al., 2012). Sin embargo, los estudios de plasticidad sobre todo a nivel de campo son complejos. Los sistemas donde las larvas de anuros habitan suelen involucrar diversos cambios en muchos factores ambientales. De todas formas, existen tres factores ambientales que son considerados de mayor relevancia en cuanto a los procesos plásticos. Uno de ellos es la disponibilidad de alimento, la cual suele estar en estrecha relación con la intensidad de la competencia intraespecífica (e.g., Laufer & Maneyro, 2008; Dziminski, 2009; Browne et al., 2003). Otro es el hidroperiodo o tiempo medio a la desecación de aquellos cuerpos de aguas temporales que los animales habitan (Loman, 1999; Gervasi & Foufopoulos, 2008). Por último, la presencia de diferentes tipos de depredadores y los niveles de depredación (Lardner, 2000; Kopp & Tollrian, 2003; Dayton et al., 2005; Relyea, 2007; Touchon & Warkentin, 2008). Sin embargo, a la fecha pocos trabajos analizan simultáneamente el efecto de más de uno de estos factores (e.g., Lane & Mahony, 2002; Relyea & Hoverman, 2003) y menos aun son aquellos que analizan el efecto combinado de los tres factores (e.g., Bridges, 2002). Esta última situación sería más aproximada a la realidad, ya que se espera que en la naturaleza estén involucrados diversos factores que actúan de forma simultánea. En este sentido, las respuestas plásticas encontradas pueden estar relacionadas con las

interacciones entre factores, muchas veces siendo los factores bióticos condicionados por los abióticos y su interacción entre estos (Indermaur, 2010, Miner et al., 2005). Por otro lado, la mayor parte de la información existente proviene de estudios en condiciones de laboratorio, lo que se relaciona con la alta complejidad que suelen involucrar los estudios en campo (Richter-Boix et al., 2007). Y si bien es cierto que en muchos casos las respuestas observadas para los estudios de laboratorio son muy parecidas a las observadas en campo (Van Buskirk, 2009), en otras ocasiones esto no sucede (Loman, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la plasticidad puede ser medida como un cambio en la respuesta fenotípica de cualquier rasgo. La forma de los individuos específicamente ha sido estudiada en recurrentes ocasiones y es una de las variables fenotípicas con mayor repercusión en la vida de la larva de un anfibio (Jara & Perotti, 2010; Dayton et al., 2005; Wilson et al., 2005; Teplitsky et al., 2003). Surge así la necesidad de encontrar una manera de “condensar” distintas variables relacionadas con la forma en una o unas pocas variables que puedan ser fácilmente evaluadas. Diversas son las estrategias adoptadas en otros trabajos para evaluar cambios en la forma de los individuos; por ejemplo, relaciones entre dos medidas morfométricas (Vences et al., 2002), la utilización de *Landmark* o formas consenso (Dayton et al., 2005), y finalmente el primer componente de un análisis de componentes principales utilizando las variables morfométricas (Merilä et al., 2004).

Dentro de este contexto, se eligió un anfibio de la familia de los Hylidos, *Hypsiboas pulchellus* (Gallardo, 1961), que habita charcos estacionales en la localidad de Barra Grande (Rocha, Uruguay), a fin de evaluar las diferencias en la forma del cuerpo que ocurren con cambios en la disponibilidad de alimento, el hidroperíodo y la abundancia de distintos depredadores. Es importante destacar que en nuestro estudio nos realizamos preguntas ecológicas tales como el tipo de patrón que presenta una población con respecto a la plasticidad de un carácter a lo largo del medio que habitan. Se ha encontrado que para este tipo de estudios un enfoque amplio de la plasticidad puede ser correcto. Dicho enfoque amplio hace referencia a colocar énfasis en el fenotipo y asumir representatividad de la muestra genotípica (Gianoli & Vallader, 2012).

2. HIPÓTESIS, RESULTADOS ESPRADOS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Las larvas de *Hypsiboas pulchellus* presentan respuestas plásticas a nivel de su morfometría frente a distintos factores ambientales –tales como la disponibilidad de recursos, la desecación y la presencia de depredadores– las cuales les permiten incrementar su adecuación biológica en ambientes altamente variables como lo son los charcos estacionales.

2.2 Resultados esperados para los factores

(1) Con respecto al alimento (indirectamente competencia) se espera que al aumentar su disponibilidad, las larvas tiendan a tener cuerpos más largos, colas más corta y reduzcan su tasa de desarrollo (Fig. 1.1). Estos cambios se deberían a que al haber mayores recursos disponibles las larvas pueden crecer más lentamente y alcanzar un mayor tamaño para un estado de desarrollo dado, aumentando las probabilidades de sobrevivencia una vez terminada la metamorfosis. Estos cambios han sido observados tanto en el laboratorio (Relyea & Hoverman, 2003; Laufer & Maneyro, 2008) como en el campo (Van Buskirk, 2009).

(2) Con respecto al hidroperíodo se espera que las larvas reduzcan su tiempo de metamorfosis conforme aumente la tasa de desecación, aunque para la forma y tamaño se espera que no haya mayores cambios (Fig. 1.2). Este aumento en la tasa de desarrollo permitiría un ciclo de vida más corto, y por tanto abandonar más rápido el cuerpo de agua antes de secarse por completo. Estos resultados han sido observados tanto en el laboratorio (Loman, 1999; Gervasi & Foufopoulos, 2008) como en el campo (Márquez-García et al, 2009; Loman, 2002).

(3) Con respecto a la depredación se espera que al aumentar el número de depredadores las larvas aumenten el tamaño de la cola (presentando aletas más grandes), pero que se reduzca el tamaño del cuerpo (con el fin de obtener mayor velocidad de nado, pudiendo potencialmente escapar con más facilidad de los depredadores); además, se espera también que aumente la tasa de desarrollo y por tanto que disminuya el tiempo a la metamorfosis. Estos cambios han sido observados tanto en condiciones de laboratorio (Lardner, 2000; Dayton et al., 2005; Touchon & Warkentin, 2008) como en estudios en campo (Van Buskirk, 2009).

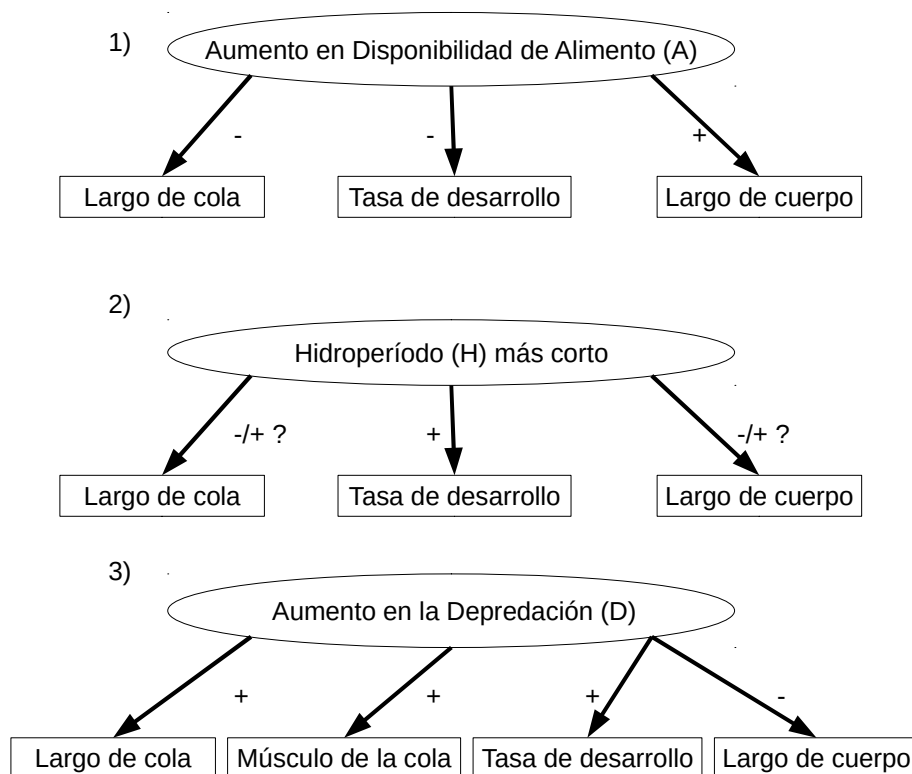


Figura 1. Comportamiento esperado de la respuesta plástica de los anfibios, en base a trabajos previos, para los factores en estudio: (1) depredación, (2) hidroperíodo y (3) disponibilidad de alimento.

2.3 Resultados esperados para las interacciones entre factores

Para el caso de la interacción entre factores resulta más complejo encontrar comportamientos esperados de los distintos rasgos fenotípicos, si bien el estudio de la depredación actuando en conjunto con la disponibilidad de alimento ha sido analizado previamente con cierta profundidad. En términos generales se espera que:

(1) Con respecto a la interacción entre la depredación y el hidroperíodo se espera que ambos factores actúen de forma independiente, no existiendo un efecto de la interacción (Fig. 2.1; Lane & Mahony, 2002).

(2) Con respecto a la interacción entre la depredación y la disponibilidad de alimento, ambos factores por sí solos resultan en morfologías opuestas (Fig. 2.2); sin embargo, en trabajos experimentales se ha observado que predomina el efecto de depredación (Relyea & Hoverman, 2003; Touchon & Warkentin, 2008; Gonzalez et al., 2011). De hecho se ha destacado la importancia de esta interacción y cómo la misma incrementa el efecto a respuestas aisladas, por ejemplo para el caso de la depredación a alta disponibilidad de recursos (McCoy, 2007; Barnett & Richardson, 2002). En estudios de campo se han observado fenómenos similares (Simith, 1995). Por lo tanto se espera un comportamiento

similar.

(3) Con respecto a la interacción entre el hidroperíodo y la disponibilidad de alimento se espera que la respuesta no sea aditiva. Se ha reportado que en larvas mantenidas con alta disponibilidad de recursos los tiempos de desarrollo son más largos para charcos de hidroperíodo corto que para charcos de hidroperíodo largo. En contraste, en condiciones de baja disponibilidad de recursos no se reportan diferencias en la tasa de desarrollo en charcos con hidroperíodos de diferente duración (Fig. 2.3; Tejedo & Reques, 1994). En cuanto a la forma de las larvas algunos autores han reportado que el efecto de los cambios en la disponibilidad del alimento es más acentuado en charcos con hidroperíodo corto que en charcos con hidroperíodo largo (Roger & Chalcraft, 2008), pero también existen estudios donde la interacción entre ambos factores no se ha encontrado significativa (Loman, 1999; Roger & Chalcraft, 2008).

(4) Con respecto a la interacción triple entre la depredación, el hidroperíodo y la disponibilidad de alimento es difícil encontrar un comportamiento esperado concreto, dada la escasez de información previa. En algunos casos se ha encontrado que la depredación y disponibilidad de alimento predominan frente a las señales de hidroperíodo. Esto fue observado en tiempos de nado, alimentación y refugio para larvas en condiciones experimentales (Bridges, 2002).

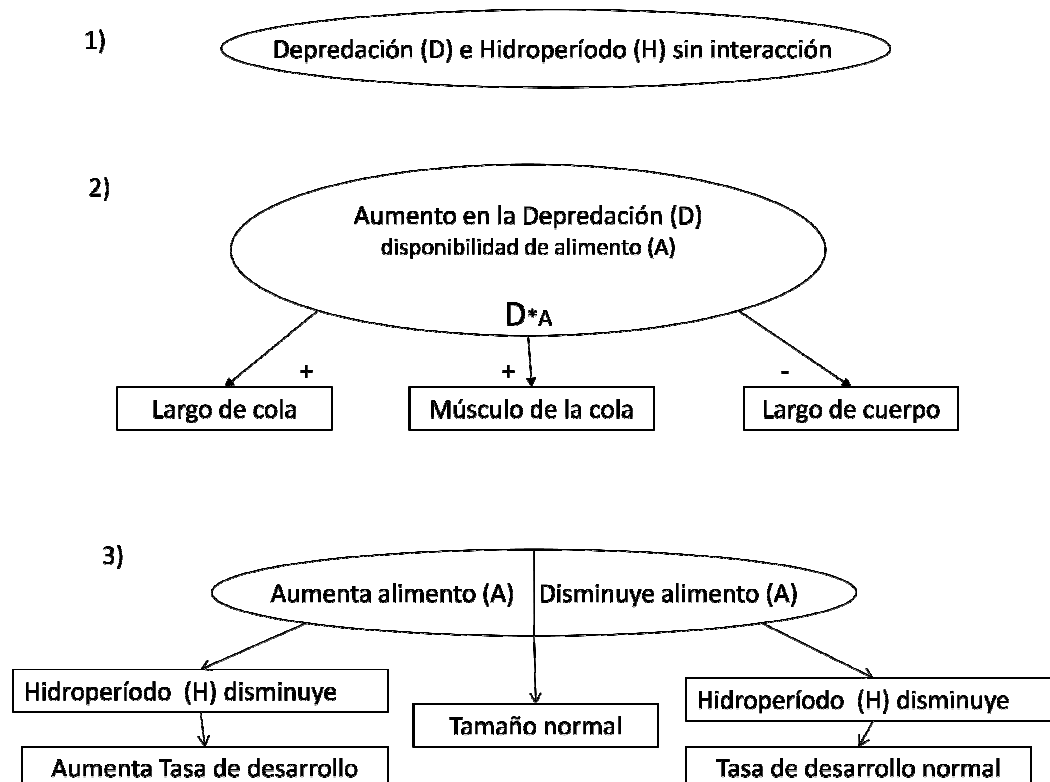


Figura 2. Comportamiento esperado, en base a trabajos previos para las interacciones de los factores en estudio: (1) depredación*hidroperíodo, (2) depredación*disponibilidad de alimento y (3) disponibilidad de alimento*hidroperíodo.

2.4 Objetivos

Objetivo General

Describir algunos atributos de la plasticidad fenotípica observada en campo en un sistema de charcos temporales en Barra Grande, Rocha, para larvas de *Hypsiboas pulchellus*.

Objetivos Específicos

- (1) Describir las diferencias en la forma de larvas de *Hypsiboas pulchellus* asociados a diferencias en la disponibilidad de alimento, el hidroperíodo y la presencia de depredadores.
- (2) Contrastar el uso de componentes principales, análisis multivariado y modelos individuales para las variables morfométricas con el fin de obtener conclusiones sobre cual es el abordaje más correcto para analizar diferencias en morfometría.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo de Estudio

La región de los Humedales del Este (Rocha, Uruguay), declarada Reserva de Biósfera por el programa MAB de UNESCO, contiene la localidad de Barra Grande (34°15.398'S 53°58.518'O), donde predominan los charcos temporales. En dicha localidad los lagos someros se encuentran llenos de agua durante el otoño e invierno y se secan al comienzo de los días de mayores temperaturas de primavera y verano. El lugar concentra en un área relativamente pequeña grandes gradientes de tamaños de cuerpos de agua (el área varía hasta en cinco órdenes de magnitud), disponibilidad de recursos y comunidades de organismos (Piñeiro Guerra, 2008). Estos charcos presentan distintas especies de anfibios (Piñeiro Guerra, 2008), entre las cuales se encuentra la rana trepadora, *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) modelo elegido para llevar adelante este estudio. *Hypsiboas pulchellus* es una especie abundante que realiza puestas todo el año y cuyas larvas son de fácil reconocimiento (Gallardo, 1961).

3.2 Muestreo en campo

Se realizó un relevamiento de las comunidades asociadas a 16 charcos temporales. En cada charco se registraron las características físicas del charco y se tomaron muestras de los diversos taxos (anfibios, peces, artrópodos) presentes en ellos. Los muestreos fueron realizados el 14 y 15 de Agosto del 2009.

En cuanto a las características físicas de los charcos se tomaron las medidas de diámetro mayor y diámetro menor, para luego calcular el área de cada charco, considerándolos como una elipse (Fig. 3). Además, la profundidad fue medida cada 5 metros, desplazándose por el diámetro mayor de borde a borde.

En cuanto al muestreo de organismos, se realizó una colecta de individuos con un calderín (20 centímetros de lado y 0.5 centímetros de malla) cada 5 metros de distancia a lo largo del diámetro mayor de cada charco (Fig. 3). En cada uno de estos puntos se realizaron tres pasadas consecutivas del calderín y todos los animales colectados fueron clasificados taxonómicamente. Los potenciales depredadores de *H. pulchellus* fueron contados en forma independiente (según orden al que pertenecían), a fin de estimar su densidad en cada charco. Por otro lado, en cada punto de muestreo se relevó la diversidad de plantas para estimar la biomasa vegetal, obteniéndose así una estimación

indirecta del alimento disponible para las larvas. Esto se realizó mediante un cuadrado de 20 centímetros de lado que fue arrojado al agua y recogido posteriormente tomando como muestra toda la vegetación dentro del mismo. Las muestras de biomasa vegetal fueron luego secadas en el laboratorio, y pesadas para obtener una estimación de biomasa vegetal (en gramos) por metro cuadrado para cada charco.

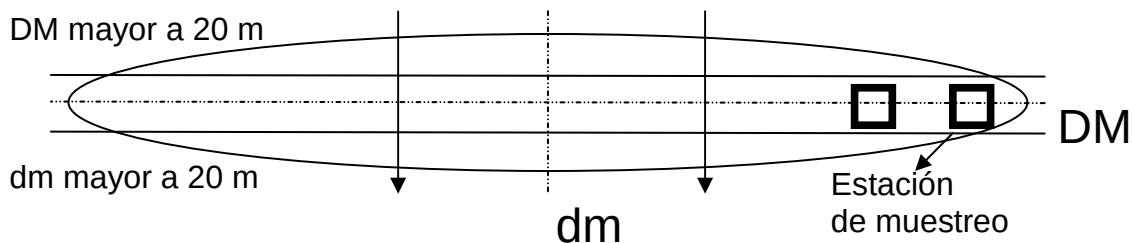


Figura 3. Distribución del muestreo para un charco tipo. DM se entiende como el diámetro mayor, dm el diámetro menor. Las líneas hacia ambos lados de los diámetros nos indican el lugar de las transectas adicionales (en caso de superar los 20 m de largo).

Finalmente, en los charcos donde se colectaron larvas de *H. pulchellus* en alguna estación de muestreo se llevó a cabo un nuevo muestreo. El mismo se realizó de la siguiente manera: a 5 metros de distancia a ambos lados de cada diámetro, se realizó una transecta y se determinó una estación de muestreo cada 5 metros, dónde se tomaron medidas de profundidad y se realizaron pasadas con el calderín. La finalidad de este segundo muestreo fue aumentar el número de larvas colectadas (Fig.3). Para evitar la superposición de los muestreos se realizó sólo una transecta sobre determinado diámetro si el opuesto no superaba los 20 metros de largo.

3.3 Variables ambientales

Con el fin de estudiar los diferentes factores que afectarían la plasticidad fenotípica de *H. pulchellus* se decidió trabajar con la profundidad promedio de cada charco como aproximación al hidroperíodo, asumiendo mayor hidroperíodo a mayor profundidad. En el caso de la depredación se construyó una variable “densidad de depredadores total” (número de individuos colectado en el charco/estaciones de muestreo del charco), la cual considera conjuntamente la abundancia de cada tipo de depredador (e.g., Belostomátidos, *Parastacus* sp. y larvas de Odonatos) dentro de cada charco. Para el caso de disponibilidad de alimento, se utilizó la medida de gramos de biomasa de plantas por metro cuadrado para cada charco.

3.4 Variables morfométricas

De cada ejemplar colectado se tomaron fotografías digitales (cámara Canon Powershot 420) de manera estandarizada para determinar las siguientes variables morfométricas (Fig. 4): largo del cuerpo (LCu, en mm), largo de la cola (LC, en mm), altura de la cola (AC, en mm), alto del músculo de la cola (AMC, en mm) y ancho de la cola (AchC, en mm). Con los datos morfométricos se calculó el volumen de la cola (VC, en mm³) asumiendo un cono de base elíptica. Todas las medidas fueron tomadas utilizando las fotografías digitales y el programa TPSDIG versión 1.30 (Rohlf, 2001). Por último se determinó el estadio de desarrollo para cada individuo según Gosner (Gosner, 1960). Los individuos fueron fijados con alcohol (95%) y depositados en la colección de Facultad de Ciencias, de la Universidad de la Republica.

Por otro lado se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando todas las variables morfométricas con el fin de obtener el primer componente (CP1), el cual ha sido sugerido como una variable que “condensa” cambios en la forma de los individuos (Merilä et al., 2004).

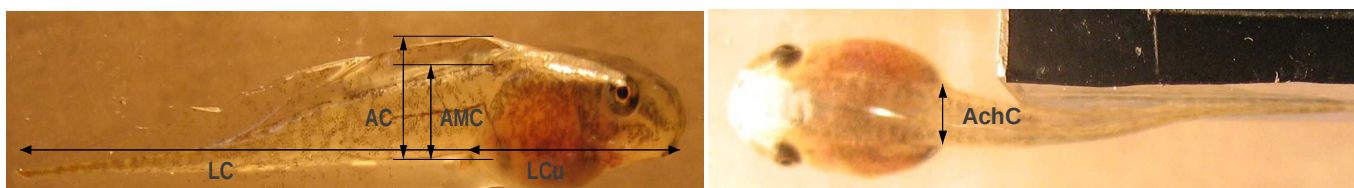


Figura 4. Medidas morfométricas tomadas a cada individuo mediante la fotografía digital. AchC: Ancho de la cola, AC: Alto de cola, AMC: Altura del músculo de la cola, LC: largo de cola, LCu: Largo de cuerpo.

3.5 Análisis estadísticos

Al mirar el estadio de desarrollo para el conjunto de los individuos se observó que existía muy poca variación al respecto: de un total de 140 individuos sólo 33 no pertenecían al estadio Gosner 25 (Anexo Fig. S1). Por otro lado hasta el estadio 25 los cambios observados son cuantitativos, pero al pasar del estadio 26 hasta el 33 se incluyen saltos cualitativos importantes (e.g., comienza el crecimiento de las patas delanteras (Gosner, 1960)), por lo que utilizar todos los estadios en conjunto implica integrar una importante fuente de heterogeneidad. Por lo tanto, los análisis y modelos estadísticos se realizaron separadamente para el total de los 140 individuos (agregando el estadio de desarrollo como co-variable) y para los 107 individuos pertenecientes al estadio Gosner 25.

Se describió mediante estadística descriptiva tanto las variables de respuesta

(variables morfométricas y componente uno del ACP) como variables explicativas (i.e., hidroperíodo, densidad de depredadores y disponibilidad de alimento).

Para evaluar el efecto de las distintas variables explicativas sobre las variables de respuesta se utilizaron modelos mixtos de regresión múltiple. El modelo completo que se probó fue el siguiente:

$$y_{ij} = CH_j + \beta_0 E_{i(j)} + \beta_1 A_{i(j)} + \beta_2 D_{i(j)} + \beta_3 H_{i(j)} + \beta_3 H_{i(j)}^2 + \beta_5 AH_{i(j)} + \beta_6 DH_{i(j)} + \beta_7 DA_{i(j)} + \beta_8 ADH_{i(j)} + \varepsilon_{ij}$$

y_{ij} corresponde a cada variable morfométrica (largo de cuerpo, largo de cola, alto de cola, alto de músculo, ancho de cola, volumen de cola) y el componente principal uno, luego tenemos CH corresponde al efecto aleatorio de charco y ε_{ij} corresponde al error experimental asociado a cada observación. Ambas dos variables aleatorias independientes e idénticamente donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ y $CH_j \sim N(0, \sigma_{ch}^2)$.

En los modelos se incluyeron como factores fijos A=alimento, D=depredación y H hidroperíodo. También las interacciones dobles y la interacción triple entre las variables independientes. El estadio (E) se incluyó como una co-variable solo en un primer análisis para toda la población. Para el caso del hidroperíodo (profundidad) se utilizó un término cuadrático además del lineal, ya que artículos recientes han sugerido la inclusión de este factor en los estudios (Simpkins et al., 2013); además, al observar los diagramas de dispersión (Anexo Fig. S1) pareció razonable esta recomendación. Para cada uno de los términos incluidos en el modelo (factores, interacciones y co-variable) se estimó un coeficiente de regresión que corresponde a β_0 hasta β_8 .

A partir del modelo completo, se realizó una selección de variables para identificar las variables explicativas que mejor explicaban el comportamiento de cada una de las variables morfométricas. En todos los casos se seleccionó el mejor modelo utilizando el método de selección "backward". Este consiste en comenzar con el modelo más complejo, con todos los parámetros y descartar aquellos que no son significativamente diferentes de cero (mediante una prueba de hipótesis utilizando el estadístico t-student, con un alfa de 0.05). En una segunda etapa el ajuste del modelo es re-calculado sin los parámetros que fueron no significativos. El proceso es repetido sucesivamente hasta llegar a un modelo donde todos los coeficientes estimados son significativamente diferentes de cero.

Por último se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) factorial utilizando simultáneamente las cinco variables morfométricas (sin el volumen de la cola).

Modelo para análisis de varianza multivariado (MANOVA):

$$Y = XB + E$$

Y es una matriz (n variables de respuestas (largo de cola, largo de cuerpo, ancho de cola, alto de cola, alto de músculo) x M observaciones).

X es una matriz de diseño (p parámetros x M observaciones) y B es una matriz de parámetros (p parámetros x M observaciones). E es la matriz de suma de cuadrados y productos cruzados de errores.

Tenemos tantos parámetros (p) como términos, uno para A, D, H y las interacciones AD, DH, AH y ADH.

Por último se analizó la variable estadio como variable de respuesta para determinar si el tiempo de desarrollo estaba afectado por alguna de las variables explicativas estudiadas. Se construyó una variable 0 / 1, donde cero representa el estadio Gosner 25 y uno representa un estadio mayor a 25. De esta forma, se construyó una regresión logística con el siguiente modelo:

$$\pi(ADH) = \frac{e^{\beta_0 A + \beta_1 D + \beta_2 H}}{1 + e^{\beta_0 A + \beta_1 D + \beta_2 H}}$$

Donde A es el alimento, D la depredación y H el hidroperíodo. π es la probabilidad de que x (estadio 25 o estadio mayor a 25) sea 0 o 1.

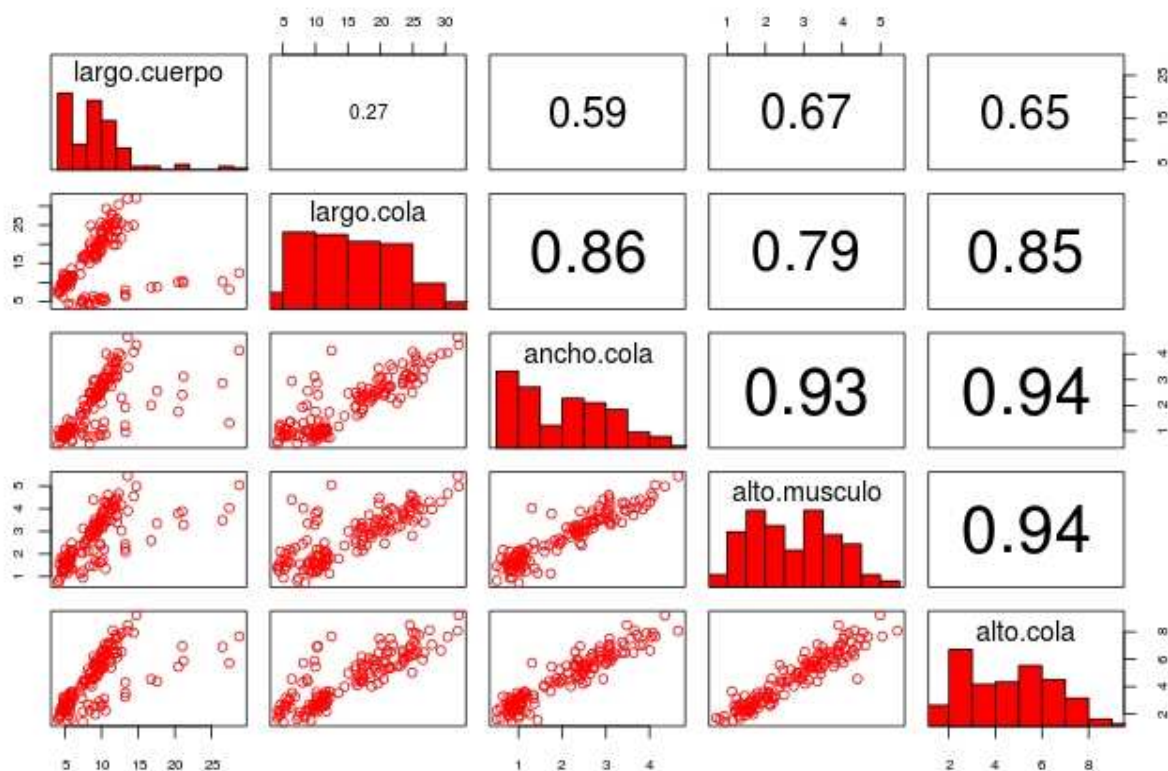
Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software libre R (R DevelopmentCoreTeam, 2008).

4. RESULTADOS

4.1 Análisis con el total de los individuos

Todas las variables de respuesta (largo de cuerpo, largo de cola, alto de cola, alto de músculo, ancho de cola) se encuentran altamente correlacionadas entre si (Fig. 5). El largo de cuerpo registra menores coeficientes de correlación con el resto de las variables, posiblemente por presentar dos grupos bien diferenciados (Fig. 5), ambos grupos poseen diferente relación largo total/largo de cola. Se corroboró que dichos grupos no estaban asociados a los charcos o estadios y no se encontró relación aparente de los grupos con ninguna característica relevada. En línea con la alta correlación entre las variables dependientes, los dos primeros componentes del ACP explican el 94% de la varianza total (82 % y 12% el primer y segundo eje respectivamente). Al graficar estos resultados en un diagrama biplot (Fig. 6) observamos que esa gran correlación se ve en los pequeños ángulos entre los vectores. En el caso del largo de cuerpo se observa un ángulo bastante mayor, reflejando nuevamente su menor correlación con el resto de las variables (Fig. 6).

Figura 5. Matriz de dispersión y correlaciones entre las variables morfométricas. En la diagonal se muestran



histogramas para largo de cuerpo, largo de cola, ancho de cola, altura del músculo de la cola y alto de cola. En la parte inferior de la diagonal se muestran los diagramas de dispersión entre todas las variables. En la parte superior de la diagonal se indican los coeficientes de correlación entre las diferentes variables de a dos.

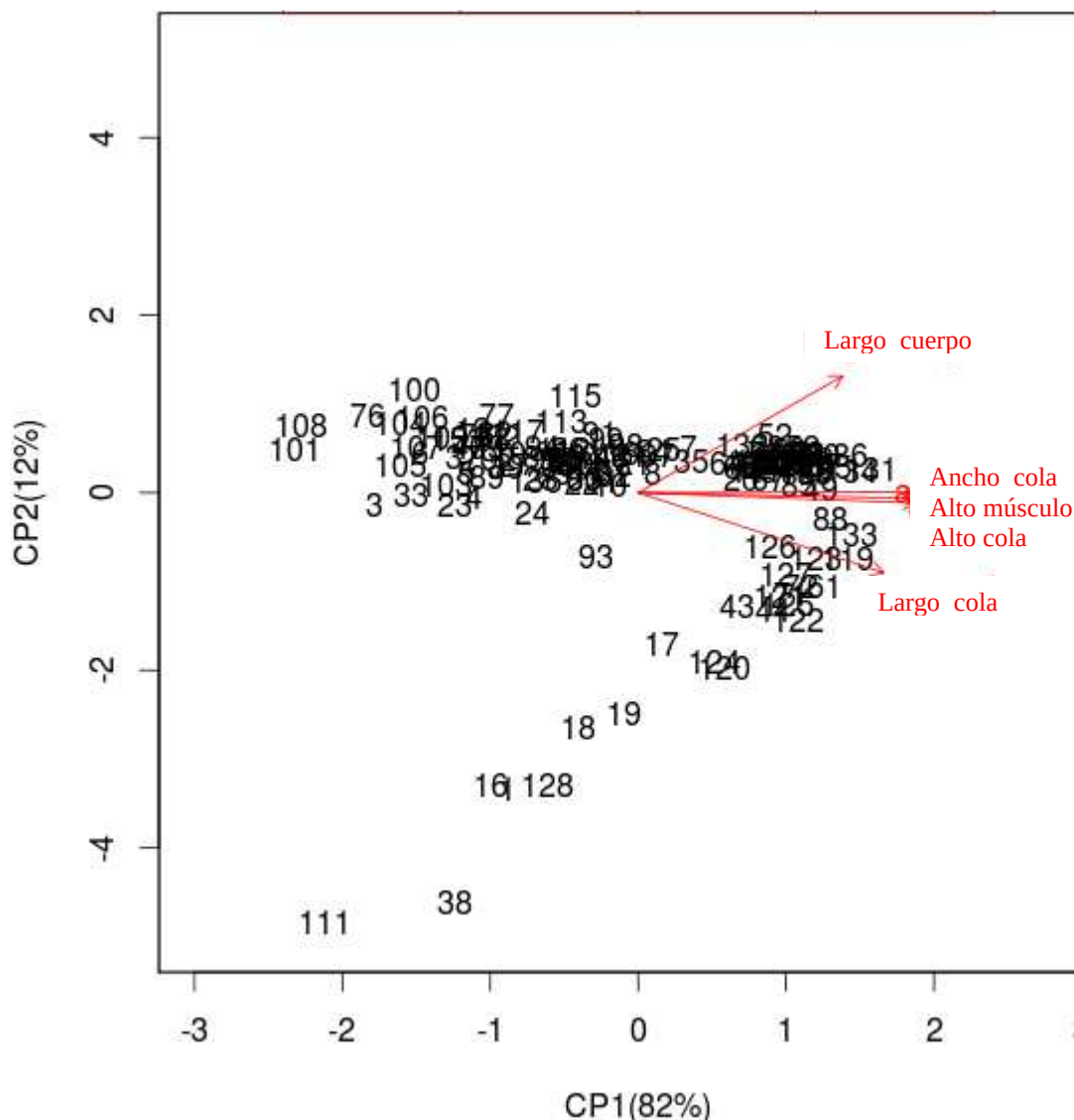


Figura6. Componente principal dos (CP2) en función del componente principal uno (CP1) obtenidos a partir del análisis de componentes principales con las variables morfométricas. Cada observación corresponde a un punto del diagrama. Los vectores representan cada una de las variables morfométricas incluidas en el ACP.

En cuanto a los modelos de regresión, lo primero que se observa es que la interacción triple (A*H*D) no fue significativa para ninguna variable de respuesta (Tabla 1; Tablas S1 – S7). Para el caso del largo de cola, el alto del músculo de la cola y el alto de la cola, los modelos finales involucran todas las variables independientes, así como la interacción entre alimento-depredación. Este comportamiento similar permite agruparlas en un diagrama de relaciones entre factores y variables (Fig. 7). De forma similar, el CP1 del ACP también formaría parte de este grupo. Para el caso del largo de cuerpo, el modelo final involucra todas las variables dependientes más las dos interacciones en las que participa el hidroperíodo (Fig. 7).

Tabla1. Coeficientes de regresión múltiple asociados a cada una de las variables explicativas con p-valores en paréntesis. No se incluye la interacción triple ya que en ningún caso participa del modelo.

	E ‡	D	A	H	H ²	AD	HD	AH
LCu †	0,65 (0,0001)	-129,86 (0,0001)	2 (0,002)	2 (0,002)	-147,19 (0,07)	§ -	325 (<0,0001)	-3,9 (0,01)
AchC	0,19 (<0,0001)	17,31 (0,046)	-0,4 (<0,0001)	-0,4 (<0,0001)	124,2 (<0,0001)	1,61 (<0,0001)	-76 (<0,0001)	-
AC	0,32 (<0,0001)	-13,3 (<0,0001)	-0,29 (<0,0001)	-0,29 (<0,0001)	97,37 (<0,0001)	1,6 (<0,0001)	-	-
VC	71,62 (<0,0001)	13861,92 (<0,0001)	-161,74 (<0,0001)	-161,74 (<0,0001)	50969,8 (<0,0001)	490,16 (<0,0001)	-45069 (<0,0001)	-
LC	1,09 (<0,0001)	-58,37 (<0,0001)	-1,18 (0,002)	-1,18 (0,002)	396,19 (<0,0001)	7,58 (<0,0001)	-	-
AMC	0,2 (<0,0001)	-7,3 (<0,0001)	-0,16 (<0,0001)	-0,16 (<0,0001)	51,96 (<0,0001)	0,94 (0,0004)	-	-
CP1	0,38 (<0,0001)	-15,32 (<0,0001)	-0,33 (<0,0001)	-0,33 (<0,0001)	104,96 (<0,0001)	1,93 (<0,0001)	-	-
MANOVA	-	-	-	(<0,0001)	¶	(<0,0001)	(<0,0001)	0,002

† LCu largo de cuerpo, AchC ancho de cola, AMC alto de músculo de la cola, AC alto de cola, VC volumen de cola, LC largo de cola.

‡ E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H² el término cuadrático de hidroperíodo. El resto de los términos se deben a las interacciones de cada uno de estos factores (AD, HD, AH).

§ Los coeficientes marcados con -fueron eliminados en el proceso de selección al resultar no significativos.

¶ El término cuadrático para el hidroperíodo no se incluyó en el MANOVA.

Por otro lado, el volumen de cola y el ancho de cola muestran un comportamiento más complejo que involucra a todas las variables independientes, la interacción entre la disponibilidad de alimento y la depredación y también la interacción entre el hidroperíodo y la depredación. Para todos los modelos fue significativa la inclusión del término cuadrático del hidroperíodo (Tabla 1; Tablas S1-S7)

Finalmente, los resultados obtenidos con el análisis de varianza son similares a los obtenidos con los modelos de regresión (Tabla 1), en cuanto a que la interacción triple no es significativa en ninguno de los casos. Con respecto a las interacciones dobles son todas significativas para el caso del MANOVA ya que en esta técnica todas las variables dependientes son consideradas en conjunto.

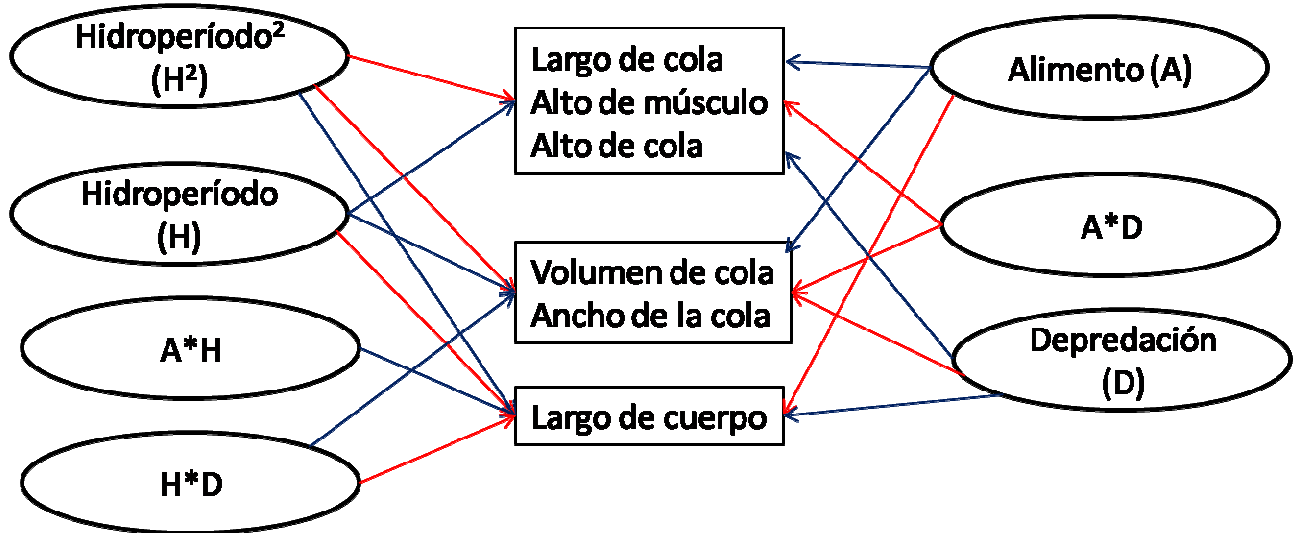


Figura 7. Diagrama de flujo para explicar las relaciones que surgen de los modelos construidos. Flechas de color rojo indican coeficientes positivos, flechas de color azul indican coeficientes negativos.

4.2 Análisis para individuos del mismo estadio (25 Gosner)

Al observar el comportamiento general de las variables registradas mediante el gráfico de dispersión se encontró nuevamente una alta correlación entre las variables morfométricas (Fig.8). Además, de forma similar al análisis con todos los individuos, el largo del cuerpo registra los menores coeficientes de correlación y vemos dos grupos definidos que poseen diferente relación largo total/largo de cola (tampoco presentan relación con las variables estudiadas). Al realizar el ACP se observa que el primer componente explica el 80% de la inercia total, el segundo componente 15%, con una proporción acumulada de 95%.

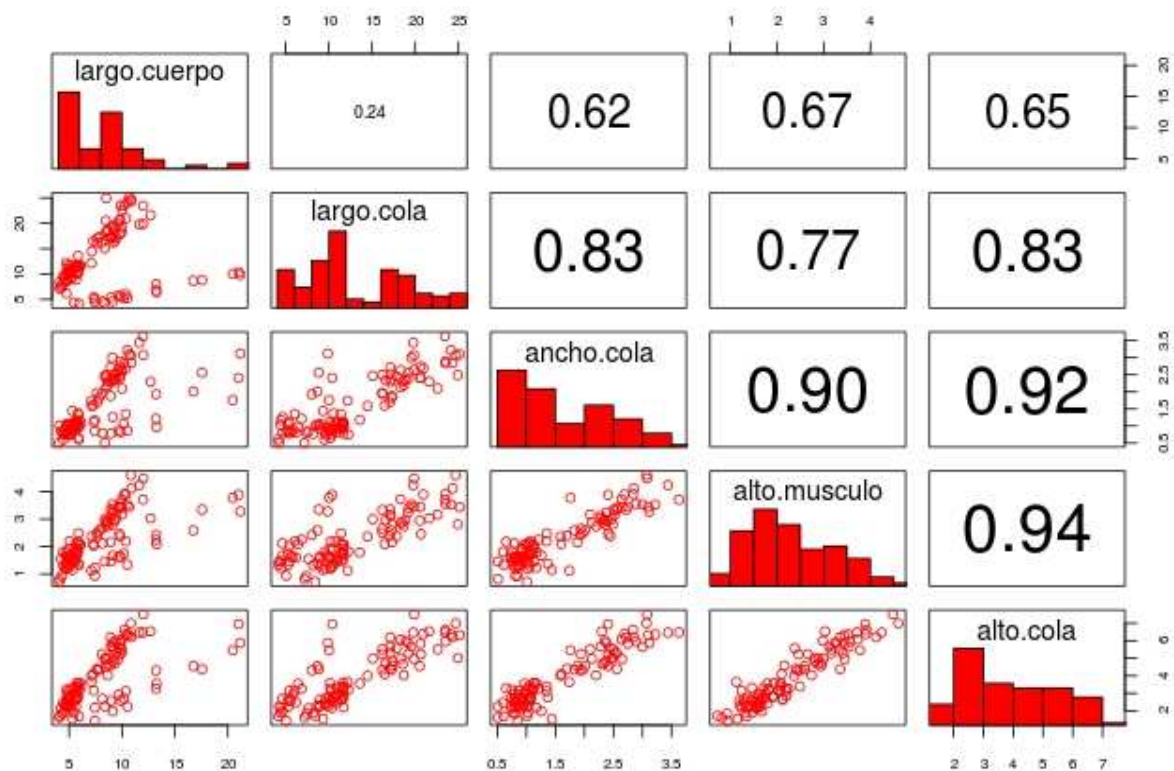


Figura. 8. Matriz de dispersión y correlaciones entre las variables morfométricas. En la diagonal se muestran histogramas para largo de cuerpo, largo de cola, ancho de cola, altura del músculo de la cola y alto de cola. En la parte inferior de la diagonal se muestran los diagramas de dispersión entre todas las variables. En la parte superior de la diagonal se indican los coeficientes de correlación entre las diferentes variables.

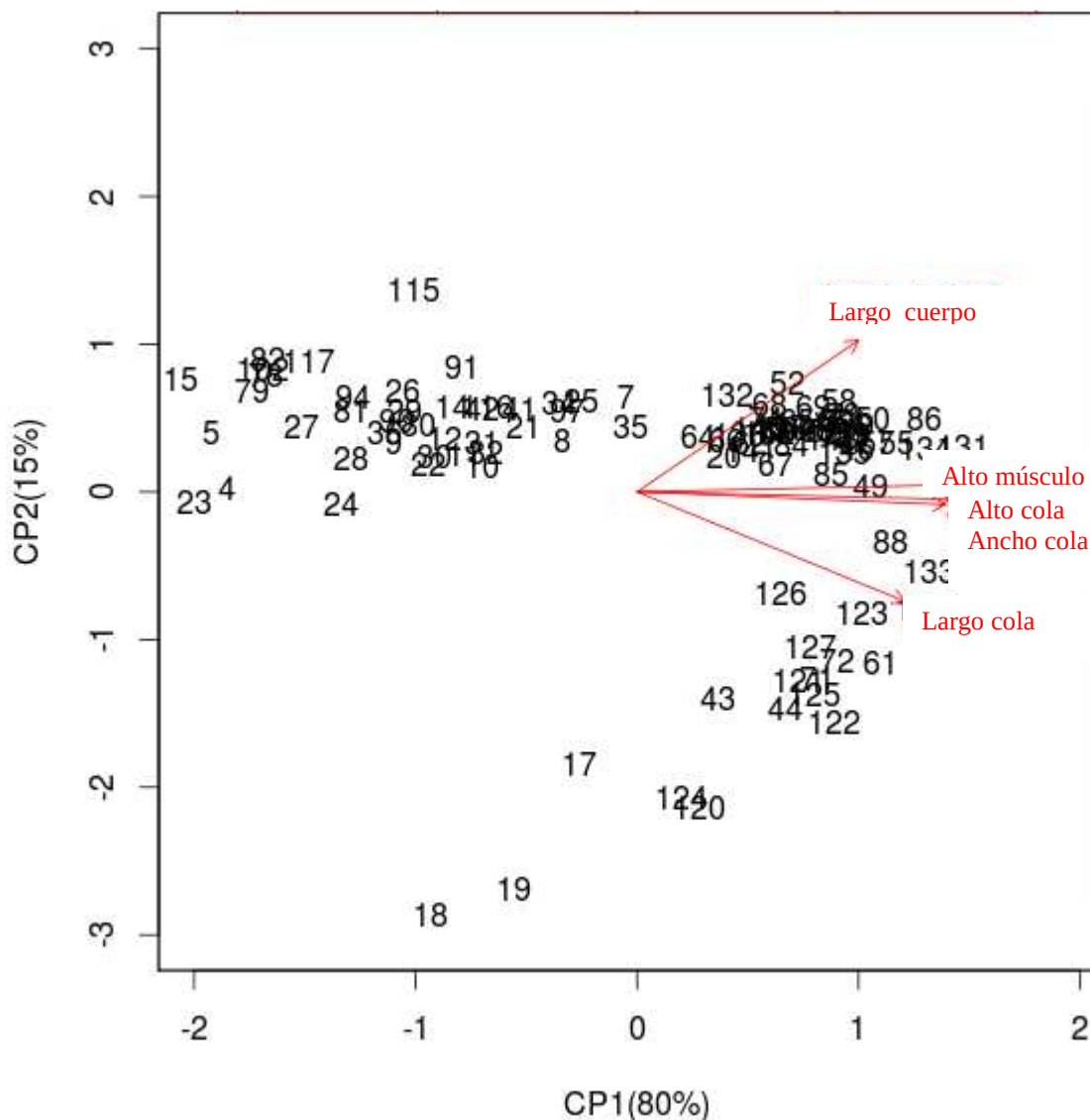


Figura 9. Componente principal dos (CP2) en función del componente principal uno (CP1) obtenidos a partir del análisis de componentes principales con las variables morfométricas. Cada observación corresponde a un punto del diagrama. Los vectores representan cada una de las variables morfométricas incluidas en el ACP.

En el diagrama biplot (Fig. 9) observamos que los ángulos entre los vectores son pequeños, con ángulos mayores para largo de cuerpo, reflejando su menor correlación con el resto de las variables dependientes (Fig. 6). Si bien el comportamiento de los componentes del ACP realizados con todos los individuos o sólo con los que pertenecen al estadio 25 es bastante similar, las medidas morfométricas en el segundo caso no incluyen valores extremos (Fig. 8).

En cuanto a los modelos de regresión múltiple nuevamente el largo del cuerpo se separa del comportamiento del resto de las variables (largo de cola, ancho de cola, alto de cola, alto de músculo). En el caso particular de ésta variable, el modelo resultante es el

nulo, indicando que ninguna variable independiente explica su comportamiento. Para las restantes variables dependientes (largo de cola, ancho de cola, alto de cola, alto de músculo y CP1), todas las variables independientes puras, el término cuadrático del hidroperíodo y la interacción entre el alimento y la depredación fueron significativas.

La interacción triple y las dos interacciones que involucran al hidroperíodo no fueron significativas en ningún caso (Tabla 3; anexo y Tablas S8 a la S13).

Tabla 3. Coeficientes de regresión múltiple asociados a cada una de las variables explicativas con p-valores en paréntesis. No se incluye la interacción triple y algunas dobles que en ningún caso participan de los modelos.

	D ‡	A	H	H ²	AD	AH	HD
LCu †	§ -	-	-	-	-	-	-
AchC	-8,25 (0,046)	-0,17 (<0,0001)	-24,9 (<0,0001)	52,58 (<0,0001)	1,07 (<0,0001)	-	-
AC	-12,13 (<0,0001)	-0,24 (0,0007)	-43,39 (<0,0001)	92 (<0,0001)	1,49 (<0,0001)	-	-
VC	-14836,81 (<0,0001)	-26,78 (0,0003)	-4422,63 (<0,0001)	9075,99 (<0,0001)	176,83 (<0,0001)	-	-
LC	-55,87 (<0,0001)	-0,82 (0,05)	-158,38 (<0,0001)	336,08 (<0,0001)	6,92 (<0,0001)	-	-
AMC	-6,66 (<0,0001)	-0,14 (0,003)	-22,13 (<0,0001)	47,29 (<0,0001)	0,87 (<0,0001)	-	-
CP1	-17,39 (<0,0001)	-0,34 (<0,0001)	-55,84 (<0,0001)	118,95 (<0,0001)	2,19 (<0,0001)	-	-
MANOVA	-	-	(<0,0001)	¶	(<0,0001)	(0,007)	(<0,0001)

† LCu largo de cuerpo, AchC ancho de cola, AMC alto de músculo de la cola, AC alto de cola, VC volumen de cola, LC largo de cola.

‡ D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H² el término cuadrático de hidroperíodo. El resto de los términos se deben a las interacciones de cada uno de estos factores (AD, HD, AH).

§ Los coeficientes marcados con -fueron eliminados en el proceso de selección al resultar no significativos.

¶ El término cuadrático para el hidroperíodo no se incluyó en el MANOVA.

Al observar el comportamiento de las variables en un diagrama (Fig.10), se encuentra que las variables de respuestas se agrupan en dos grupos bien definidos: el largo del cuerpo por un lado y todas las variables restantes por el otro. Para el conjunto de variables de igual comportamiento el efecto del hidroperíodo podría analizarse directamente ya que sus interacciones no participan en el modelo.

Nuevamente, el CP1 muestra el mismo comportamiento que en el análisis con todos los individuos (Tabla 3), acompañando al grupo de variables (Fig. 9).

Finalmente, los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza se aproximan al estudio que incluye a todas las observaciones (Tabla 3). En breve, para el caso del análisis multivariado se observa que la interacción triple no es significativa, mientras que todas las interacciones dobles lo son. Para el caso de CP1 encontramos como única interacción significativa es aquella entre el alimento y la depredación (Tabla 3).

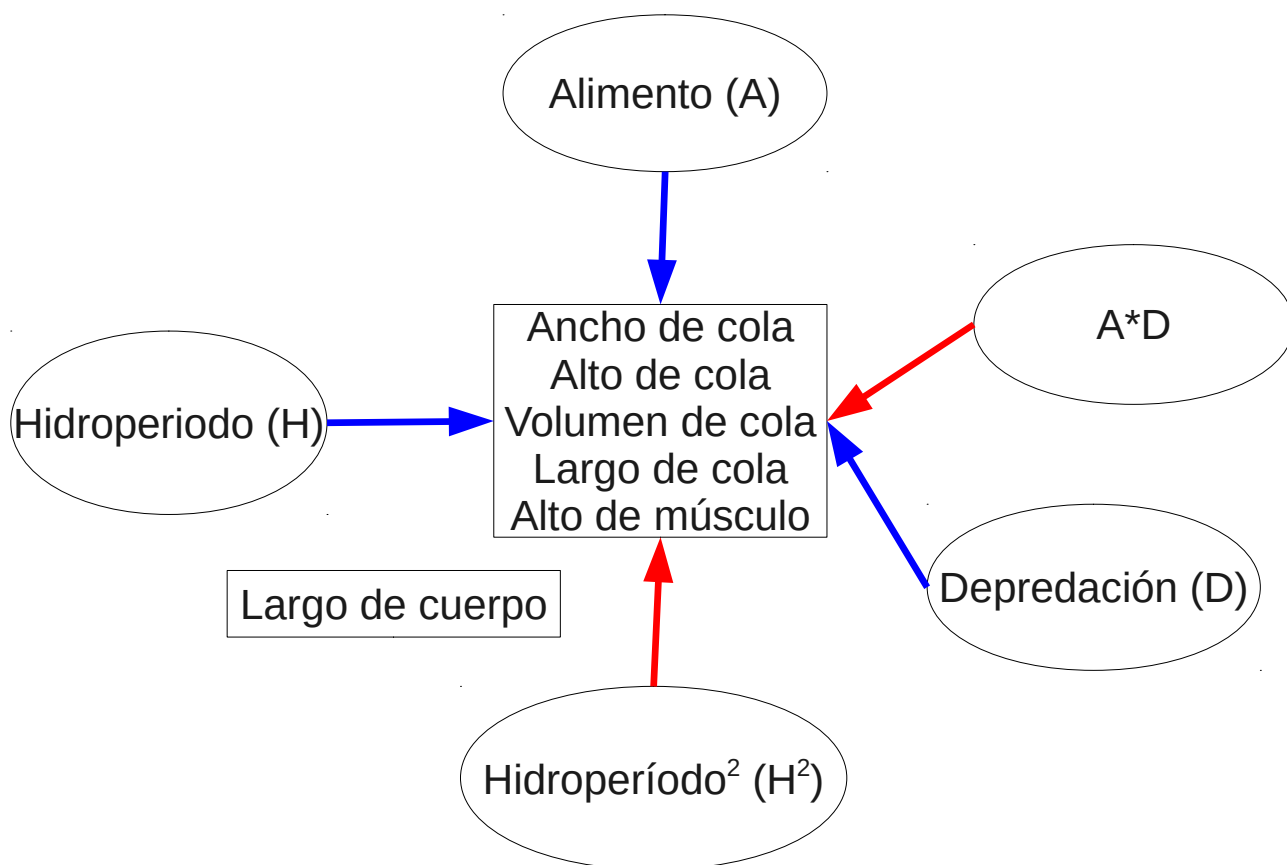


Figura 10. Diagrama de flujo para explicar las relaciones que surgen de los modelos construidos. Flechas de color rojo indican coeficientes positivos, flechas de color azul indican coeficientes negativos.

4.3 Análisis comparativo con todos los individuos y los individuos del estadio 25

De forma comparativa, para ambos análisis la interacción de mayor orden (triple) fue no significativa (Tabla 1 y 3), quedando fuera del modelo. Al mirar la similitud entre los modelos obtenidos para ambos análisis vemos que en el caso de todos los individuos y en el de los estadios 25 (Tabla 1 y 3) el alto del músculo de la cola, largo de la cola, altura de cola y CP1 poseen el mismo comportamiento con estimaciones muy próximas. Para el caso de largo de cuerpo en ambos modelos tiene un comportamiento diferente al resto de

las variables, incluso en el caso de los individuos del estadio 25, no se encontró relación con ninguna variable explicativa.

Para el caso del hidroperíodo, no participa en ninguna de las interacciones de la subpoblación de estadios 25, y en tres variables de las seis estudiadas con todos los individuos, así como para el CP1. En ambos análisis para todos los modelos el coeficiente encontrado para el cuadrado del hidroperíodo es positivo. Para el caso del término de primer orden es siempre negativo.

De forma comparativa en ambos análisis, todos los modelos en el caso de Gosner 25 y cuatro variables del análisis con todos los individuos (alto del músculo de la cola, largo de cola, altura de cola y CP1) presentaron como única interacción significativa aquella entre el alimento y la depredación, por lo que se utilizó un superficie de respuesta para estudiar más en profundidad su comportamiento.

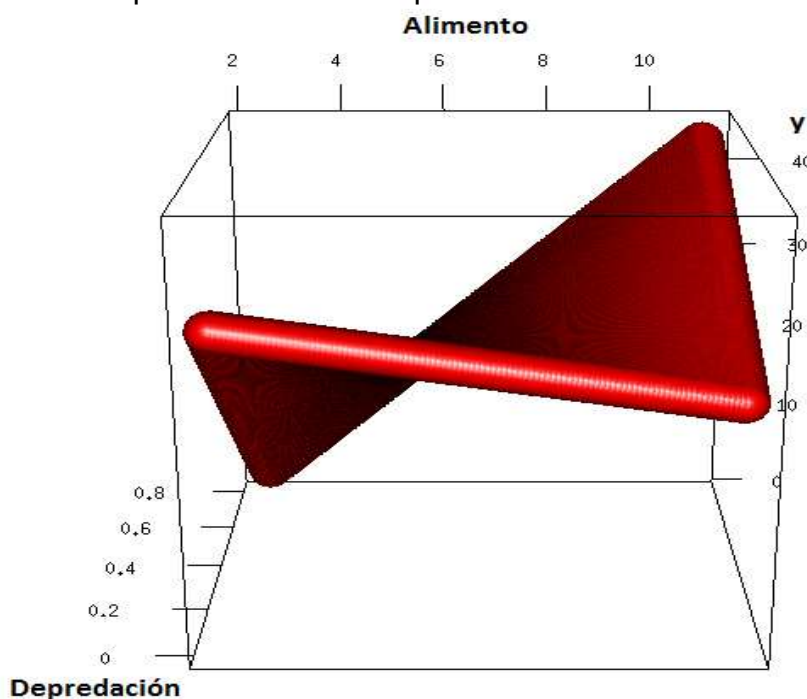


Figura 11. Representación gráfica en tres dimensiones (superficie de respuesta) de la interacción Alimento-Depredación obtenida para los modelos de regresión múltiple. Las variables de respuesta son representadas en el eje y pudiendo ser largos de cola, alto de cola, alto de músculo, ancho de cola y volumen de cola.

En este sentido la Fig. 11 muestra la superficie de respuesta modelada por interacción de orden lineal, donde la respuesta de una variable de respuesta y está condiciona por dicha interacción. Es importante recalcar que y puede ser, cualquier variable salvo el largo del cuerpo en el análisis con individuos en estadio de desarrollo Gosner 25, o el alto del músculo de la cola, la altura de cola, el largo de cola y el CP1 en el análisis con todos los individuos (Tabla 1 y 3).

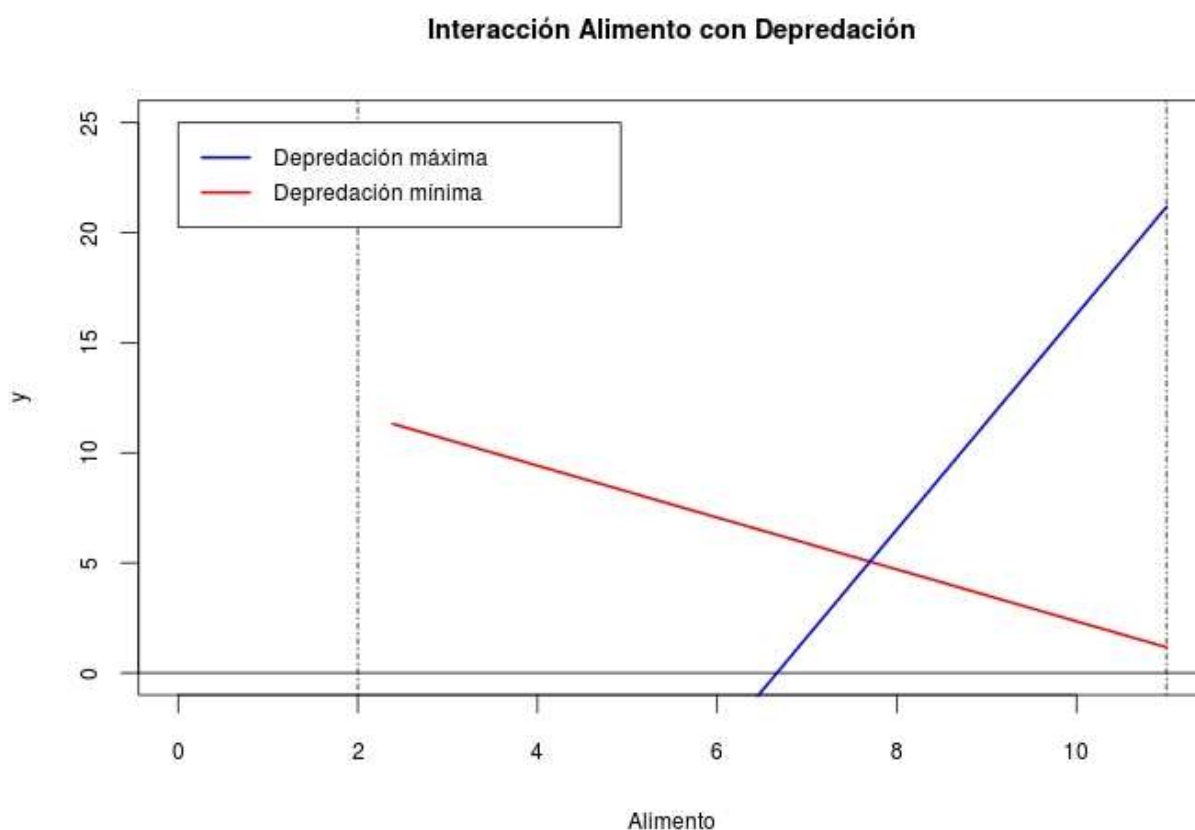


Figura.12. Representación gráfica en dos dimensiones de la interacción Alimento-Depredación obtenida para los modelos de regresión múltiple. Las variables de respuesta son representadas en el eje y pudiendo ser largos de cola, alto de cola, alto de músculo, ancho de cola y volumen de cola. Tenemos una recta para cada uno de los límites de la depredación (máximo y mínimo).

Si estudiamos en más detalle esta interacción podemos ver que para valores mínimos de depredación el comportamiento de la variable de respuesta y con respecto a el alimento es monótono decreciente. Sin embargo, cuando nos encontramos en valores máximos de depredación, el comportamiento de la variable de respuesta y es totalmente opuesto, respondiendo de forma monótona creciente con respecto al alimento (Fig.12). Ambas situaciones son independientes del hidroperíodo.

4.4 Análisis de la variable estadio: regresión logística.

Al realizar el estudio de la variable estadio encontramos que la regresión logística se ajusta a los datos. En particular, vemos que el alimento no tiene un efecto relevante sobre esta variable (odd ratio cercano a uno), pero sí encontramos grandes diferencias para los

otros dos factores (Tabla 4). Para todo los casos tenemos odd ratio significativamente diferentes de cero (Tabla 4). En el caso del hidroperíodo tenemos un valor mucho mayor que uno, indicando un incremento en la probabilidad de tener estadios mayores a 25 a medida que aumenta del hidroperíodo (aumento de la profundidad). Por el contrario, para el caso de la depredación observamos que existe una fuerte tendencia a disminuir la probabilidad de tener estadios mayores a 25 al aumentar la depredación.

Tabla 4. Cocientes de probabilidad (Odd ratio) para los parámetros estimados en la regresión logística del estadio 25. P- valor asociado para cada Odd ratio donde la hipótesis nula es el parámetro iguala cero.

Factor	Odd ratio	P-valor
Depredación	0,06	*0,001
Alimento	1,35	*0,0001
Hidroperíodo	413,27	*0,002

Podemos observar los gráficos de nuestra variable dicotómica (0: estadio 25, 1: estadio mayor a 25) con respecto a las variables explicativas (Fig. 13). En el caso del alimento se observan valores de $y=0$ e $y=1$ para todos los valores de alimento, similar a tener un odd ratio cercano a 1. Para el caso del hidroperíodo los valores de $y=1$ se concentran en hidroperíodos altos y de forma inversa para la depredación los valores de $y=1$ se concentran en valores bajos de depredación.

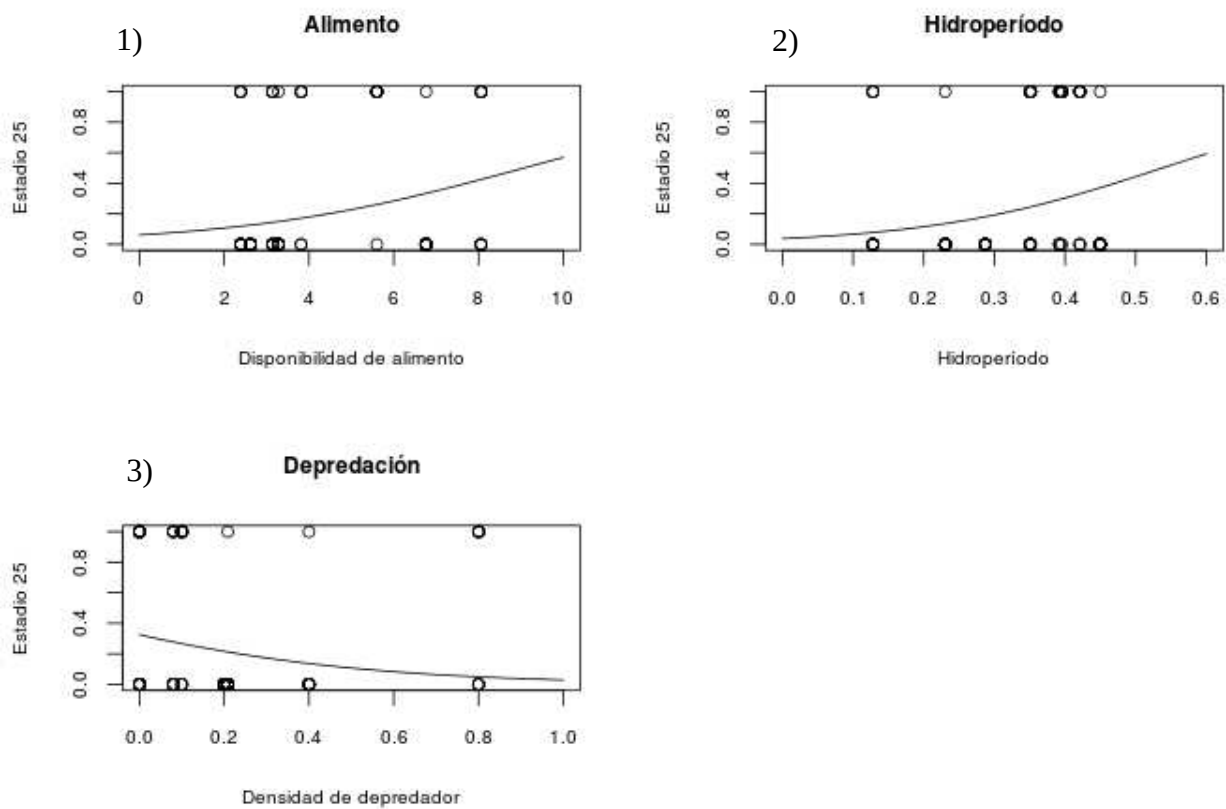


Figura.13. Regresión logística para al variable estadio 25 o superior. En el gráfico uno tenemos la variable de respuesta en función de la disponibilidad de alimento, el segundo gráfico en función del hidroperíodo y el tercer gráfico en función de la depredación.

5. DISCUSIÓN

5.1 *.Sobre la hipótesis de partida.*

1) Se observaron cambios en la forma de las larvas relacionados con diferentes escenarios de hidroperíodo, disponibilidad de alimento y densidad de depredación en los charcos temporales evaluados. Dada la alta conectividad entre los charcos es esperado que estos cambios sean representativos de fenómenos de plasticidad fenotípica. Podemos interpretar que algunos de estos patrones encontrados les permiten incrementar a las larvas su adecuación biológica a ambientes altamente variables como lo son los charcos estacionales.

2) Los tres abordajes para las variables morfométricas, i.e., el uso de las propias variables, el uso del CP1 del ACP y el análisis de la varianza multivariado, arrojaron resultados similares, validando cualquiera de estos tres análisis para la evaluación de diferencias en la forma. Probablemente, este resultado esté relacionado con la alta correlación que existe en todas las variables morfométricas.

5.2 *.Evaluación de los cambios en la morfología.*

Para el caso de los modelos de regresión utilizamos el estadio como co-variable cuando trabajamos con toda la población. De esta forma podemos ajustar el modelo por las variables explicativas (hidroperíodo, depredación y alimento) y luego la co-variable. Al realizar el ajuste de esa manera podemos luego asumir que el estadio si dependía de los tratamientos. Recordemos que una co-variable como tal no puede depender de los tratamientos para que pueda ser incluida como tal en un modelo. Por otro lado las principales conclusiones de los modelos fueron hechas en base a los que no consideraban el estadio, solo para los Gosner 25, otra razón más para no preocuparnos de la dependencia del estadio con las variables explicativas de interés (hidroperíodo, disponibilidad de alimento y depredación).

Sobre los resultados para los modelos se observó un patrón general, apoyado en todos los casos para el estudio de los estadios 25, y en cuatro variables cuando consideramos la población general. Las diferencias entre el abordaje con todos los

individuos y sólo los del estadio 25 pueden estar dadas por la gran variabilidad que se introduce al trabajar con toda la población (si bien se incluyó el estadio como co-variable en los modelos estadísticos). En ambos análisis el largo del cuerpo fue diferente al resto de las variables asociadas a la cola, resultando en modelos diferentes al largo de cola, ancho de cola, alto de cola, alto de músculo. Éstos resultados son apoyados por otros trabajos que han estudiado ampliamente que las variables del cuerpo y de la cola cambian de maneras diferente (e.g, Relyea & Hoverman, 2003; Dayton et al, 2005). Además, en todo los casos los modelos para las variables relacionadas a la cola no apoyan la interacción triple, situación similar a lo encontrado en otros estudios, donde la interacción triple por su complejidad no es considerada (Bridges, 2002). En el caso de las interacciones dobles, sobre todo la interacción Depredación – Alimento (disponibilidad), si fueron significativas (de hecho esta interacción entre depredación y alimento fue la única apoyada para los individuos en estadio 25). También en el estudio arriba mencionado sobre el efecto de los tres factores esta interacción fue la única significativa (Bridges, 2002). De hecho muchos trabajos se centran únicamente en esta interacción por ser de las más importantes y la única que implica un verdadero compromiso (trade-off), ya que ambos factores por si solos favorecen morfos completamente diferentes (Relyea & Hoverman, 2003; Touchon & Warkentin, 2008; Gonzalez et al., 2011; Simith, 1995).

El hidroperíodo no participó de ninguna interacción significativa para los individuos en estadio Gosner 25, por lo que podemos ver su efecto directamente (Tabla 3). En este sentido, el término cuadrático para el hidroperíodo fue significativo en todos los modelos, situación que concuerda con trabajos recientes (Simpkins, 2013). En el estudio de Simpkins (2013) se obtuvieron formas convexas para la variable dependiente “abundancia”. En nuestro caso se observó una respuesta cóncava para las variables morfométricas de la cola lo que nos indica que estas son mínimas a hidroperíodo (profundidades) medias. Para profundidades muy bajas o muy altas las dimensiones de las colas son máximas. A profundidades grandes tenemos en general cuerpo de aguas más estables situación que hace más favorable a que allí habiten más potenciales depredadores de las larvas (larvas de insectos por ejemplo) lo que conlleva a tener colas más grandes (aumento de las variables morfométricas) para favorecer los escapes (Simpkins, 2013). De igual modo, a profundidades pequeñas si bien un charco puede tener pocos depredadores la probabilidad de encontrar uno es más alta por el poco volumen de agua, lo que lleva a que las larvas nuevamente tiendan a desarrollar mayores colas para poder escapar con mayor facilidad (Vences

et al., 2002).

Sobre los resultados esperados para los factores y sus interacciones, la única variable que no mostró una clara relación con los distintos factores ambientales fue el largo del cuerpo.

Sobre las predicciones para los factores y sus interacciones, la única variable que no mostró una clara relación con los distintos factores ambientales fue el largo del cuerpo. Diversos estudios muestran que esta variable cambia de forma plástica (e.g, Van Buskirk, 2009; Touchon & Warkentin, 2008), y por tanto, era de esperar *a priori* encontrar algún modelo fuera significativo para la misma. Sin embargo, se ha resaltado la importancia que tienen otros factores abióticos no considerados en este estudio sobre dicha variable. Por ejemplo, se ha observado que la temperatura tienen un efecto muy importante sobre el largo corporal con respecto a otros factores como ser disponibilidad de alimento, hidroperíodo y depredación (Indermaur, 2010, Miner et al., 2005). Podría ser entonces, que el efecto de estos factores no considerados haya anulado el efecto de los factores que fueron considerados. En este sentido, cabe decir que es teóricamente esperable que exista una correlación inversa al menos entre la temperatura y algunos de los factores evaluados (e.g., hidroperíodo).

Para el caso de la interacción alimento - depredación, como se mencionó antes existe una gran documentación de su importancia y del rol que juega este “trade-off” entre depredación (más precisamente la probabilidad de ser depredado) y la alimentación en varios taxas (Higginson et al., 2012) y también en larvas de anfibios (Relyea & Hoverman, 2003; Touchon & Warkentin, 2008; Gonzalez et al., 2011). En nuestro caso en particular (Fig.12), se observó que los datos están de acuerdo con la “regla del presupuesto energético” (Soto et al, 2005; Smallegange, 2008). Es decir, cuando la presión de depredación es baja la disponibilidad de alimento determina la forma de la cola: conforme aumenta la disponibilidad de alimento las larvas disminuyen sus largos de cola invirtiendo energía en alcanzar los estadios con mejores condiciones corporales y un mayor tamaño (Relyea & Hoverman, 2003; Van Buskirk, 2009). Sin embargo, cuando la depredación es muy alta el efecto de esta predomina favoreciendo el crecimiento de la cola a medida que aumenta la cantidad de alimento disponible. Este último escenario también fue observado en otros trabajos que han encontrado que la depredación domina frente a la disponibilidad de alimento (Relyea & Hoverman, 2003; Touchon & Warkentin, 2008; Gonzalez et al., 2011). Más aún, otros estudios han encontrado como los efectos de la depredación son amplificados y más notorios a ciertos niveles de disponibilidad de recursos (McCoy, 2007;

Barnett & Richardson, 2002), claro ejemplo de la interacción entre estos factores.

5.3. Evaluación de los cambios en la variable estadio.

Como se discutió anteriormente, el estadio se trabajó luego como variable de respuesta para ver su dependencia con las variables hidroperíodo, disponibilidad de alimento y depredación.

Al mirar los cambios en esta variable con respecto a la disponibilidad de alimento podemos ver que los resultados (un odd ratio muy cercano a uno) son bastante similares a los resultados esperados, ya que en general se espera que al aumentar la disponibilidad de alimento las variables que más sufran cambios sean las morfométricas, no así el tiempo de desarrollo. Mientras algunos autores señalan una posible disminución de la tasa de desarrollo para el aumento disponibilidad de alimento (Relyea & Hoverman, 2003; Laufer & Maneyro, 2008; Van Buskirk, 2009) otros han encontrado situaciones opuestas donde a mayor densidad de individuos (menos recursos) las larvas disminuyen su tasa de desarrollo (Gouchie et al, 2008). En base a estos estudios es bastante lógico encontrar que el alimento ni favorece ni retrasa el estadio (odd ratio cercano a uno).

En cuanto al hidroperíodo, los resultados indican que un incremento en la probabilidad de pasar del estadio 25 conforme aumento el hidroperíodo (o, en otras palabras, la profundidad). Este resultado es contrario a lo esperado, ya que la tasa de desarrollo debiera ser mayor cuanto más alta es la probabilidad de desecación del cuerpo de agua (Loman, 1999; Gervasi & Foufopoulos, 2008; Márquez-García et al, 2009; Loman, 2002). Si bien existe suficiente información sobre el aumento en la tasa de desarrollo frente a la reducción del hidroperíodo se puede haber encontrado este comportamiento opuesto porque las larvas de esta especie no sean tan sensibles a la desecación y la regulación de su desarrollo (Richter-Boix et al., 2007; Matt, 2012) Otra opción es la existencia de otras interacciones con factores que no han sido tomados en cuenta que enmascaran o inhiben el efecto del hidroperíodo (Vences et al., 2002; Enriquez-Urzela et al, 2013). Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, la relación con la temperatura podría determinar que las menores profundidades implicaran también una mayor temperatura del agua, y por tanto una mayor tasa de desarrollo (Jara, 2010). Tal vez la segunda opción pueda ser la más aproximada ya que encontramos una respuesta, aunque no era la esperada. Es importante destacar que en nuestro estudio se trabajó el hidroperíodo como la

profundidad. Si bien es un abordaje posible, tal vez para el estudio no sea el mejor indicador de hidroperíodo. Utilizando indicadores de hidroperíodo desarrollados en la misma zona de estudio (Vidal, 2011) no se encontró variabilidad, por lo que quedaron descartados y se optó trabajar con la profundidad.

Con respecto a la depredación sucedió lo esperado donde el aumento provocó que la probabilidad de pasar a estadios más avanzados que 25 disminuya en forma importante (valor de “odd ratio” menor a 1), o lo que es lo mismo, se favorezca el retraso del desarrollo (Lardner, 2000; Dayton et al., 2005; Touchon&Warkentin, 2008; Van Buskirk, 2009; Jara, 2010). La magnitud tan pequeña del “odd ratio” podría deberse a las unidades en las que fue medida la depredación (nº de depredadores/sobre número de estaciones de muestreo) ya que el valor del “odd ratio” nos muestra la disminución en la probabilidad de pasar el estadio 25 conforme aumento una unidad la depredación. Una unidad en la depredación significa un depredador por estación de muestreo, que podría ser un aumento muy fuerte en la depredación explicando el valor tan pequeño de “odd ratio”.

5.4 .Consideraciones finales

Para nuestro estudio encontramos gran variabilidad para las variables de la cola de las larvas, así como su estadio asociadas a la variabilidad ambiental. De esta forma podemos afirmar que nuevamente se constató que *H. pulchellus* es un buen modelo para el estudio de plasticidad, conclusión arribada también en otros trabajos (Kerh 1987; 1989). Al mismo tiempo, se recalca tanto la necesidad como la dificultad de realizar estudios en campo. Al trabajar fuera de experimentos controlados ampliamos el número de variables que pueden intervenir en los procesos en estudio. Puede ser de interés registrar otras variables que afecten la morfología de las larvas, que no fueron tomadas en cuenta en este trabajo y tienen documentada relación con las larvas, como ser la temperatura, el pH, y la calidad del alimento. Este fenómeno podría ser una causa por la cual no encontramos cambios asociados a los factores de estudio para la variable largo de cuerpo o diferencias en predicciones ampliamente constatadas como es el caso de la tasa de desarrollo y el hidroperíodo.

Como en estudios previos, en el presente trabajo se encontró que las interacciones complejas entre varios factores (triple) son bastante poco frecuentes, sugiriendo que tal vez los procesos de escalas mayores no involucran todas las posibles interacciones. Por otro lado, muchas veces es esperable de todas formas que más

de un factor actúa al mismo tiempo dependiendo de otros. Sin embargo puede ser difícil detectar estadísticamente estos efectos de interacción ya que muchas veces algunas interacciones pueden contrarrestarse con otras y no dar un efecto neto aparente. Nuevamente se ve remarcada la necesidad y a la vez dificultad de hacer estudios en campo, donde las interacciones posibles son muchas, situación no tan controlada como en un experimento, pero un escenario más realista.

Sin embargo es interesante destacar que si bien todos los resultados esperados no se vieron reforzados en el estudio, se refuerza la evidencia en campo para esta especie de la relación o trade-off entre la depredación y la alimentación, así como su gran importancia en los procesos plásticos. Tal vez este tipo de evidencia nos puede ayudar a comprender los cambios que suceden al sufrir modificaciones producto de la acción humana en los ambientes donde la larva habita.

6. PERSPECTIVAS A FUTURO

Finalmente, vale mencionar algunas consideraciones que podrían en el futuro incrementar nuestro entendimiento en relación a los resultados obtenidos:

1) Sería interesante realizar un estudio de morfología geométrica mediante la utilización de landmarks. Con estos se podría estudiar las variaciones que sufren tanto la cola como el cuerpo. Se determinan algunos landmark que podrían ser de utilidad (Fig. 9).

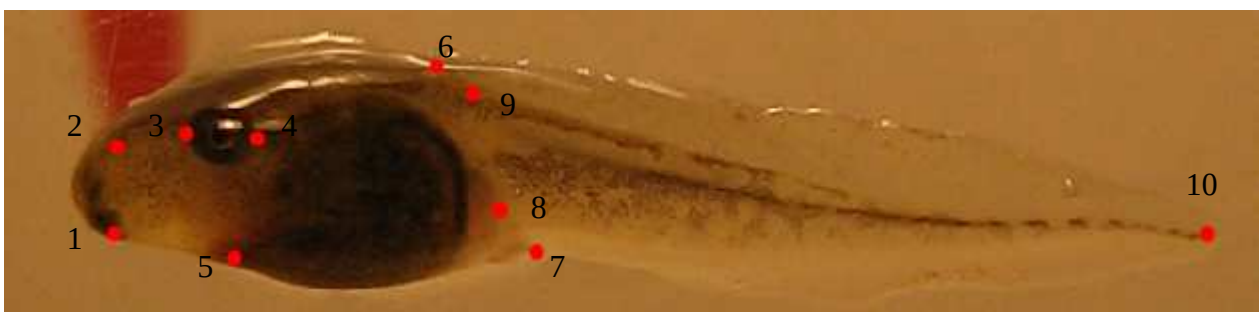


Figura 9. Landmark propuestos para el estudio. Ubicados de izquierda a derecha: Boca (1), narina (2), diámetro ocular (3 y 4), comienzo del intestino (5), inserción aleta dorsal (6), inserción aleta ventral (7), inserción músculo aleta ventral (8), inserción músculo aleta dorsal (9), final de la cola (10).

2) Sobre los grupos bien diferenciados en relación largo total/largo de cola que se encontraron (Fig. 5 y Fig. 8). En estudios posteriores podría ser interesante relevar otros

tipos de variables en campo que pudieran diferenciar ambos grupos, por ejemplo mayor número de variables ambientales como ser pH, la temperatura, etc. Si bien se modela por un efecto charco, puede que estas variables no sean homogéneas en todo el charco con efectos de variaciones locales.

3) Mejorar las formas de estimar las variables explicativas del estudio. Una mejor aproximación del hidroperíodo que no considere únicamente la profundidad, desarrollando algún indicador más de hidroperíodo. Alguna otra medida de disponibilidad de alimento, por ejemplo clorofila "a" o acompañar las estimaciones de biomasa con medidas de calidad del alimento.

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 Magdalena Carabio y Fernando Larrañaga, por ser mis compañeros en este proyecto. A Lucía Gutierrez y Daniel Naya por ser mis tutores en el trabajo de grado, brindando su tiempo, conocimiento y apoyo en todo lo necesario para la culminación de esta etapa. Al Departamento de Biometría Estadística y Computación de Agronomía (DBEC) por brindarme el tiempo necesario para realizar la tesina y la ayuda de todos mis compañeros de trabajo que en uno u otro momento han colaborado en esto. A mi familia y amigos que siempre han estado, a todos ellos gracias.

8. REFERENCIAS

- Barnett, H.K., Richardson, J.S. (2002). Predation risk and competition effects on the life-history characteristics of larval Oregon spotted frog and larval red-legged frog. *Oecologia*, 132(3), 436-444.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L. (2005). Ecology: From Individuals to Ecosystems (John Wiley & Sons). 4th Ed. Blackwell. Oxford.
- Bridges, C.M. (2002). Tadpoles Balance Foraging and Predator Avoidance: Effects of Predation, Pond Drying, and Hunger. *Journal of Herpetology* 36, 627–634.
- Browne, R. ., Pomeroy, M., Hamer, A. .(2003). High density effects on the growth, development and survival of *Litoria aurea* tadpoles. *Aquaculture*, 215(1-4), 109-121.
- Buskirk, J.V. (2009). Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecological Monographs*, 79(4), 681-705.

- Dayton, GH., Saenz, D., Baum, KA., Langerhans, RB., DeWitt, TJ. (2005). Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos* 111, 582–591.
- Denver, RJ. (1997). Environmental Stress as a Developmental Cue: Corticotropin-Releasing Hormone Is a Proximate Mediator of Adaptive Phenotypic Plasticity in Amphibian Metamorphosis. *Hormones and Behavior* 31, 169–179.
- Dziminski, MA. (2009). Intraspecific Competition in the Larvae of Quacking Frogs (*Crinia georgiana*). *Copeia*.
- Enriquez-Urzelai, U., San Sebastián, O., Garriga, N., and Llorente, GA. (2013). Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia*.
- Ficetola, GF., Bernardi, FD. (2006). Trade-off between larval development rate and Post-metamorphic Traits in the Frog *Rana latastei*. *Evol Ecol* 20, 143–158.
- Fisher, RA (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*, Oxford University Press, Oxford.
- Gallardo JM (1961). Observaciones biológicas sobre *Hyla raddiana* Fitz; en la provincia de Buenos Aires. *Ciencia e Investigación* 14, 460–465.
- Gervasi, SS., 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, Valladares F. (2012). Studying phenotypic plasticity: the advantages of a broad approach. *Biological Journal of the Linnean Society* 105, 1–7.
- Gosner KL (1960). A simplified table for stating anuran embryos and larvae with notes on identification. *16*, 183 –190.

Gouchie, GM., Roberts, LF., and Wassersug, RJ. (2008). The effect of mirrors on African clawed frog (*Xenopus laevis*) larval growth, development, and behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 1821–1829.

Higginson, AD., McNamara, JM., and Houston, AI. (2012). The Starvation-Predation Trade-Off Predicts Trends in Body Size, Muscularity, and Adiposity between and within Taxa. *The American Naturalist* 179, 338–350.

Indermaur, L., Schmidt, BR., Tockner, K., Schaub, M. (2010). Spatial variation in abiotic and biotic factors in a floodplain determine anuran body size and growth rate at metamorphosis. *Oecologia*, 163(3), 637-649.

Jara FG (2010). Plasticidad fenotípica en anuros patagónicos de los géneros *Pleurodema* y *Rhinella*: respuestas al hidroperíodo y a los depredadores. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.

Jara, FG., and Perotti, MG. (2010). Risk of predation and behavioural response in three anuran species: influence of tadpole size and predator type. *Hydrobiologia* 644, 313–324.

Junges, CM., Peltzer, PM., Lajmanovich, RC., Attademo, AM., Cabagna Zenklusen, MC., and Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish–tadpole interaction. *Chemosphere* 87, 1348–1354.

Kehr AI (1987) Crecimiento individual en larvas de *Hyalapulchella 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 *Hyalapulchella pulchella* (Amphibia: Anura). *Limnobiología*, 2, 757-761.

- KehrAI (1992). Disposición espacial de las masas de huevos y estados larvales en una población de *Hylapulchellapulchella* (Anura: Hylidae). pp. 135–142.
- Kopp, M., and Tollrian, R. (2003). Reciprocal phenotypic plasticity in a predator–prey system: inducible offences against inducible defences? *Ecology Letters* 6, 742–748.
- Lajmanovich, RC., Peltzer, PM., Cabagna-Zenklusen, MC., Junges, CM., & Attademo, AM. (2012). Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 11(3), 184-198.
- Lane, SJ., Mahony, MJ. (2002). Larval anurans with synchronous and asynchronous development periods: contrasting responses to water reduction and predator presence. *Journal of Animal Ecology* 71, 780–792.
- Lardner, B. (2000). Morphological and life history responses to predators in larvae of seven anurans. *Oikos* 88, 169–180.
- Laufer, G., Maneyro, R. (2008). Experimental Test of Intraspecific Competition Mechanisms Among Tadpoles of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Zoological Science* 25, 286–290.
- Laurila, A., Karttunen, S., Merilä, J. (2002). Adaptive Phenotypic Plasticity and Genetics of Larval Life Histories in Two *Rana temporaria* Populations. *Evolution* 56, 617–627.
- Loman, J. (1999). Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia* 20, 421–430.
- Loman, J. (2002). Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *Journal of Zoology*, 258(01), 115-129.

- Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M., Méndez, M. (2009). Effects of pond drying on morphological and life-history traits in the anuran *Rhinellaspina* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research*, 11(5), 803–815.
- Michel, MJ (2012). Phenotypic plasticity in complex environments: effects of structural complexity on predator- and competitor-induced phenotypes of tadpoles of the wood frog, *Rana sylvatica*. *Biol. J. Linn. Soc.* 105, 853–863.
- McCoy, MW. (2007). Conspecific density determines the magnitude and character of predator-induced phenotype. *Oecologia*, 153(4), 871-8.
- Merilä, J., Laurila, A., Lindgren, B. (2004). Variation in the degree and costs of adaptive phenotypic plasticity among *Rana temporaria* populations. *Journal of Evolutionary Biology* 17, 1132–1140.
- Miner, BG., Sultan, SE., Morgan, SG., Padilla, DK., and Relyea, RA. (2005). Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 685–692.
- Pigliucci M (2001) Phenotypic Plasticity. Beyond Nature and Nurture. *Johns Hopkins University Press*. Baltimore.
- Piñeiro JM (2008). Relación productividad-diversidad en comunidades vegetales de charcos temporales. Universidad de la República, UdelaR.
- R Development Core Team (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).
- Relyea, RA. (2003). Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications* 13, 1515–1521.
- Relyea, RA. (2007). Getting out alive: how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia* 152, 389–400.

- Relyea, RA., Hoverman, JT. (2003). The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia* 134, 596–604.
- Relyea, RA., Schoeppner, N.M., and Hoverman, J.T. (2005). Pesticides and amphibians: The importance of community context. *Ecological Applications* 15, 1125–1134.
- Richter-Boix, A., Llorente, GA., Montori, A. (2007). A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiologia* 583, 43–56.
- Rogers, TN., Chalcraft, DR. (2008). Pond hydroperiod alters the effect of density-dependent processes on larval anurans. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(12), 2761-2768.
- Rohlf, FJ (2001). TPSdig, v. 1.31 (NY: State University at Stony Brook).
- Simpkins, CA., Shuker, JD., Lollback, GW., Castley, JG., and Hero, JM. (2013). Environmental variables associated with the distribution and occupancy of habitat specialist tadpoles in naturally acidic, oligotrophic waterbodies. *Austral Ecology*.
- Smallegange, IM., Hidding, B., Eppenga, JMA., and Van der Meer, J. (2008). Optimal foraging and risk of claw damage: How flexible are shore crabs in their prey size selectivity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 367, 157–163.
- Smith, DC., Van Buskirk, J. (1995). Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. *American Naturalist*, 211–233.
- Soto, RE. Castilla JC., Bozinovic F (2003). The impact of physiological demands on foraging decisions under predation risk: a test with the whelk *acanthinamonodon*.
- Teplitsky, C., Plénet, S., Joly, P. (2003). Tadpoles' responses to risk of fish introduction. *Oecologia*, 134(2), 270-277.

- Touchon, JC., Warkentin, KM. (2008). Fish and dragonfly nymph predators induce opposite shifts in color and morphology of tadpoles. *Oikos* 117, 634–640.
- Van Buskirk, J. (2002). A Comparative Test of the Adaptive Plasticity Hypothesis: Relationships between Habitat and Phenotype in Anuran Larvae. *The American Naturalist* 160, 87–102.
- Vences, M., Puente, M., Nieto, S., Vieites, DR. (2002). Phenotypic plasticity of anuran larvae: environmental variables influence body shape and oral morphology in *Rana temporaria* tadpoles. *Journal of Zoology* 257, 155–162.
- Vidal N (2011). Dinámica de las interacciones entre zooplancton y peces anuales en ambientes temporales. Universidad de la República, UdelaR.
- Whitman, DW., Ananthakrishnan, TN. (2009). Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences (Science Publishers).
- Wilson, RS., Kraft, PG., VanDamme, R. (2005). Predator-specific changes in the morphology and swimming performance of larval *Rana lessonae*. *Functional Ecology*, 19(2), 238-244.

ANEXO

Se incluye aquí otras salidas de los análisis que explican con mayores detalles los modelos obtenidos, error estándar, estimación, valor de t y p-valor (Tabla S1-S13). También se adjunta un grafico de dispersión para todas las variables de estudio (Fig S1).

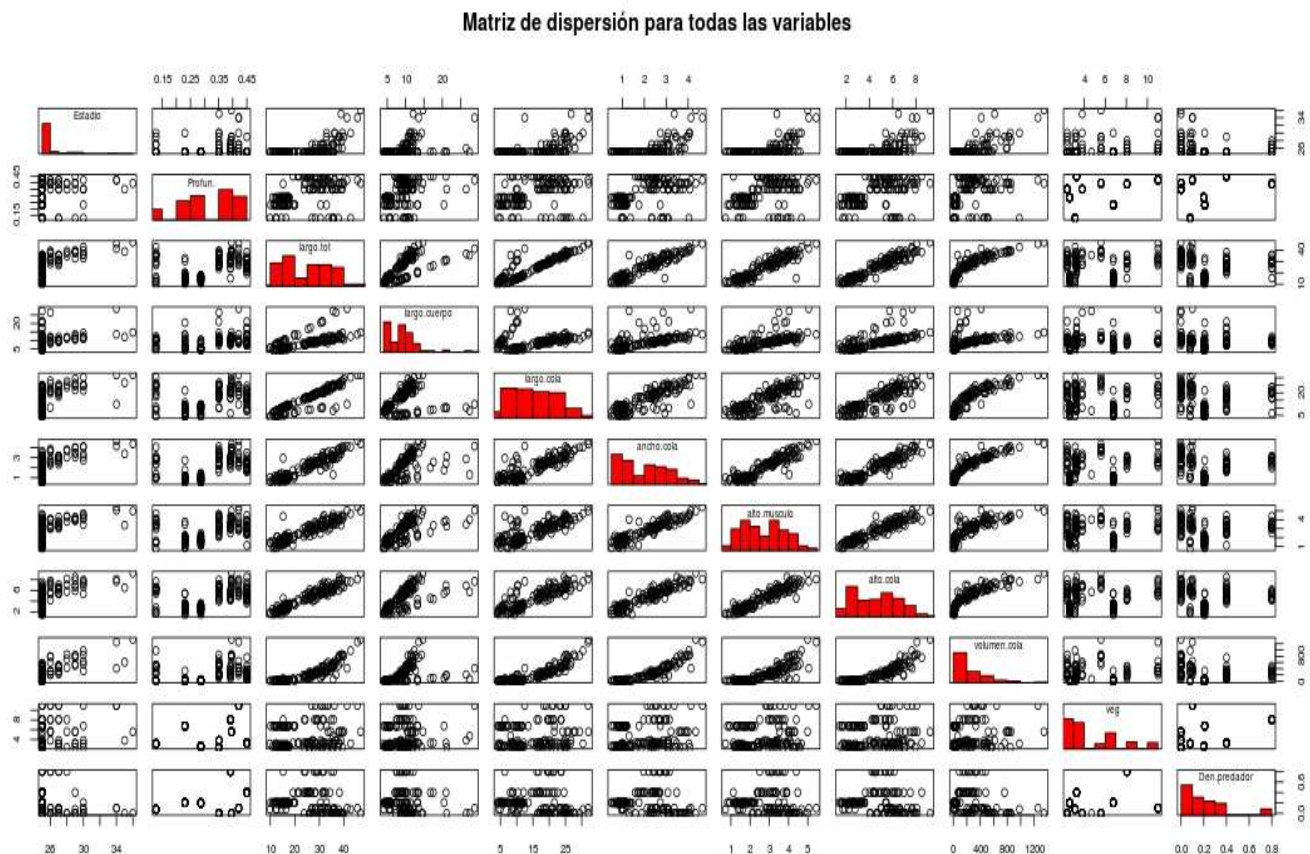


Figura. 1 S. Diagrama de dispersión para la variable de respuesta, en relación a los factores de interés.

En la diagonal del gráfico de dispersión vemos las distribuciones de las variables, para el caso de Estado, vemos la gran concentración en el Gosner 25. También se puede ver la correlación entre las variables de respuesta, y las similitudes en los comportamientos de todas ellas con respecto a los factores explicativos.

En cuanto a los modelos, para el análisis utilizando todo los individuos, los resultados de la selección backward fueron los siguientes:

En el caso de largo de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S1)

Tabla S1. Regresión múltiple para la variable largo de cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H^2 el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estandar	valor de t	p-valor
Intercepto	14.1348	8.6617	1.632	1.054767e-01
E	1.0869	0.1990	5.463	5.214347e-07
D	-58.3684	11.0327	-5.291	1.118756e-06
A	-1.1787	0.3571	-3.301	2.040964e-03
H	-182.4012	43.9737	-4.148	1.155749e-04
H^2	369.1784	75.2922	4.903	5.899401e-06
D*A	7.5790	1.5081	5.025	3.529803e-06

Para el caso de ancho de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S2)

Tabla S2. Regresión múltiple para la variable ancho de cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H^2 el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estandar	valor de t	p-valor
Intercepto	2.44460	0.83985	2.911	6.364454e-03
E	0.19370	0.02019	9.596	2.325860e-16
D	17.31352	8.29789	2.086	4.607883e-02
A	-0.40462	0.07102	-5.697	1.820564e-07
H	-53.84156	8.90009	-6.050	3.493215e-08
H^2	124.20750	22.03683	5.636	2.407212e-07
D*A	1.61292	0.17660	9.133	3.159164e-15
D*H	-75.77440	24.00649	-3.156	3.162558e-03

Para el caso de alto del músculo de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S3)

Tabla S3. Regresión múltiple para la variable alto del músculo de la cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H^2 el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	0.93299	0.98933	0.943	2.547808e-01
E	0.20185	0.02986	6.761	1.048505e-09
D	-7.30360	0.92193	-7.922	2.403466e-12
A	-0.15901	0.03150	-5.048	3.200969e-06

H	-25.00676	3.48072	-7.184	1.200573e-10
H ²	51.96083	5.87903	8.838	1.567532e-14
D*A	0.93644	0.12725	7.359	4.815771e-11

Para el caso de alto de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S4)

Tabla S4. Regresión múltiple para la variable alto de la cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H² el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	2.68810	1.78896	1.503	1.288287e-01
E	0.31975	0.04661	6.861	6.316291e-10
D	-13.29906	2.05767	-6.463	4.645319e-09
A	-0.29214	0.06754	-4.325	5.946630e-05
H	-46.34240	8.08936	-5.729	1.554239e-07
H ²	97.37191	13.83043	7.040	2.527614e-10
D*A	1.60665	0.28160	5.705	1.736089e-07

Para el largo de cuerpo, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S5)

Tabla S5. Regresión múltiple para la variable largo de cuerpo, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H² el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estandar	valor de t	p-valor
Intercepto	-11.3554	5.2176	-2.176	0.0382297613
E	0.6458	0.1560	4.140	0.0001194201
D	-129.8561	36.7625	-3.532	0.0009850926
A	2.0066	0.6118	3.280	0.0021791966
H	63.4349	34.1214	1.859	0.0714075333
H ²	-147.1852	78.6266	-1.872	0.0697280362
D*A	3.9021	1.4908	-2.618	0.0137567012
D*H	324.7943	94.3136	3.444	0.0013071023

Para el volumen de cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S6)

Tabla S6. Regresión múltiple para la variable volumen de cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H² el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estandar	valor de t	p-valor
Intercepto	76.643	236.354	0.324	3.776709e-01
E	71.621	5.681	12.608	7.556652e-24
D	13861.920	2335.219	5.936	5.990897e-08
A	-161.736	19.986	-8.092	9.910471e-13

H	-21117.940	2504.691	-8.431	1.557593e-13
H ²	50969.828	6201.676	8.219	4.968627e-13
D*A	490.164	49.699	9.863	5.113975e-17
D*H	-45068.938	6755.985	-6.671	1.680345e-09

Por último tenemos el CP1, componente principal uno del ACP, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S7)

Tabla S7. Regresión múltiple para el CP1, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. E representa el estadio, D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	2.70722	1.50979	1.793	8.038025e-02
E	-0.37708	0.04556	-8.276	3.506546e-13
D	15.32257	1.40693	10.891	1.319017e-19
A	0.32591	0.04807	6.780	9.525087e-10
H	50.37737	5.31183	9.484	4.140646e-16
H ²	-104.96113	8.97182	-11.699	1.251300e-21
D*A	-1.93264	0.19419	-9.952	2.888538e-17

En cambio los modelos obtenidos con la selección backward al trabajar solo con los individuos del estadio Gosner 25 fueron los siguientes:

En el caso de largo de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S8)

Tabla S8. Regresión múltiple para la variable largo de cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	35.7098	6.7875	5.261	1.763975e-06
D	-55.8729	11.4724	-4.870	8.636829e-06
A	-0.8173	0.3995	-2.046	5.017759e-02
H	-158.3828	44.8664	-3.530	1.060342e-03
H ²	336.0789	76.4622	4.395	5.362837e-05
D*A	6.9153	1.5879	4.355	6.219076e-05

En el caso de ancho de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S9)

Tabla S9. Regresión múltiple para la variable ancho de cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	5.30073	0.43173	12.278	3.208932e-21
D	-8.24719	0.71834	-11.481	1.653963e-19

A	-0.17268	0.02867	-6.023	6.613792e-08
H	-24.89975	2.65587	-9.375	6.341577e-15
H ²	52.58297	4.38710	11.986	1.352969e-20
D*A	1.06625	0.10586	10.073	1.903748e-16

En el caso de alto del músculo de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S10)

Tabla S10. Regresión múltiple para la variable alto del músculo de la cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	5.40252	0.66921	8.073	4.134689e-12
D	-6.66270	1.11348	-5.984	7.865903e-08
A	-0.14322	0.04444	-3.223	2.711083e-03
H	-22.13395	4.11679	-5.377	1.086392e-06
H ²	47.29037	6.80032	6.954	9.180579e-10
D*A	0.87060	0.16409	5.306	1.462628e-06

En el caso de alto de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S11)

Tabla S11. Regresión múltiple para la variable alto de la cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	9.8806	0.9985	9.896	4.633286e-16
D	-12.1375	1.6614	-7.306	1.719933e-10
A	-0.2428	0.0663	-3.663	6.916138e-04
H	-43.3907	6.1424	-7.064	5.455370e-10
H ²	91.9887	10.1463	9.066	2.982494e-14
D*A	1.4934	0.2448	6.100	4.689467e-08

En el caso de volumen de la cola, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S12)

Tabla S12. Regresión múltiple para la variable volumen de la cola, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	804.248	101.783	7.902	9.567532e-12
D	-1436.812	169.355	-8.484	5.426614e-13
A	-26.782	6.759	-3.963	2.525723e-04
H	-4422.629	626.143	-7.063	5.481312e-
H ²	9075.994	1034.294	8.775	1.276035e-13
D*A	176.829	24.957	7.085	4.937827e-10

Por último tenemos el CP1, componente principal uno del ACP, al realizar la selección llegamos al siguiente modelo (Tabla .S13)

Tabla S13. Regresión múltiple para el CP1, donde tenemos el estimado de cada coeficiente, el error estándar asociado, t y su p-valor correspondiente. D la depredación, A el alimento, H el hidroperíodo, H²el término cuadrático para el hidroperíodo. El resto de los términos se debe a las interacciones de cada uno de estos factores.

	Estimado	Error estándar	valor de t	p-valor
Intercepto	7.89944	1.20094	-6.578	5.319781e-09
D	17.38929	1.99822	8.702	1.835883e-13
A	0.34108	0.07975	4.277	8.279776e-05
H	55.83688	7.38784	7.558	5.107144e-11
H ²	-118.94675	12.20360	-9.747	9.795754e-16
D*A	-2.19456	0.29446	-7.453	8.482323e-11