
PEDECIBA-BIOLOGÍA
SUBÁREA ZOOLOGÍA

TESIS DE MAESTRÍA

“Biología reproductiva, movimientos y uso de microhábitat en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay”



LIC. GISELA PEREIRA

Montevideo, marzo 2014

Tesis de Maestría: “Biología reproductiva, movimientos y uso de microhábitat en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay.”

PEDECIBA/ Biología/ Zoología

Autor: Lic. Gisela Pereira

Dirección de e-mail: gisepe04@gmail.com.uy

Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, UDELAR

Orientador: Dr. Raúl Maneyro

Tribunal: Dra. Susana González, Dr. Gabriel Francescoli y Dr. Arley Camargo.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	6
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCION GENERAL	11
Crisis Global de la Biodiversidad: la situación de los anfibios	12
Fauna de Anfibios de Uruguay. El género <i>Melanophryniscus</i> Gallardo 1961 y <i>Melanophryniscus montevidensis</i>	13
Marco teórico	16
Presentación de la Tesis	19
BIBLIOGRAFÍA	21
CAPÍTULO 1. “Patrones de actividad reproductiva en una población uruguaya de <i>Melanophryniscus montevidensis</i> (Anura: Bufonidae)”	27
INTRODUCCIÓN	28
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Área de estudio	31
Trabajo de campo y toma de datos.....	32
Procesamiento y análisis de datos	35
RESULTADOS	36
Patrones de actividad	36
Proporción de sexos y dimorfismo sexual.....	37
Fecundidad e inversión reproductiva en hembras.....	40
Trabajo de laboratorio con animales colectados	43
FI de individuos en actividad reproductiva	43
DISCUSIÓN	45
Patrones de actividad	45
Proporción de sexos	46
Dimorfismo sexual.....	48
Trabajo de laboratorio con animales colectados	50
Foto-identificación de individuos en actividad reproductiva.....	50
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
APÉNDICE 1	58
CAPÍTULO 2. “Uso del microhábitat reproductivo en una población de <i>Melanophryniscus montevidensis</i> (Anura: Bufonidae) de Uruguay”	61
INTRODUCCIÓN	62
MATERIALES Y MÉTODOS:	64
Área de estudio	64
Trabajo de campo y toma de datos.....	65
Procesamiento y análisis de datos	66
RESULTADOS	67
Descripción del microhábitat reproductivo.....	67
Uso del microhábitat reproductivo	70
Manifestaciones comportamentales.....	75
DISCUSIÓN	78

Caracterización y uso del microhábitat reproductivo	78
Manifestaciones comportamentales	81
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
CAPÍTULO 3. “Análisis de los movimientos en una población uruguaya de Melanophryniscus montevidensis (Anura: Bufonidae) a través del reconocimiento individual por fotoidentificación”	90
INTRODUCCIÓN	91
MATERIALES Y MÉTODOS:	93
Área de estudio	94
Trabajo de campo y toma de datos	94
Procesamiento y análisis de datos	95
RESULTADOS	97
Capturas y recapturas	97
Actividad de los individuos y relación con variables climáticas	100
Análisis de los movimientos	103
DISCUSIÓN	105
Capturas y recapturas	105
Actividad de los individuos y relación con variables climáticas	106
Análisis de los movimientos	108
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	111
CONCLUSIONES GENERALES	115
PERSPECTIVAS	118
ANEXO 1. La zona de estudio	119
BIBLIOGRAFÍA	126
ANEXO 2. Imágenes de los sitios de muestreo seleccionados en la Barra de la Laguna de Rocha	128
ANEXO 3. Artículo a ser sometido a la revista <i>Phyllomedusa</i>	131

A mis padres

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron para que este trabajo fuera posible:

- En primer lugar quiero agradecer a mi orientador Raúl Maneyro que me dio la oportunidad de formar parte de este grupo de trabajo desde hace ya 5 años. Gracias por confiar en mi desde el primer momento... por la amistad, las palabras de aliento en esos días difíciles en los cuales “no me salía nada”, por tantos momentos, experiencias, y anécdotas compartidas! Gracias por contribuir a mi crecimiento profesional y personal!
- A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por el apoyo financiero.
- A Susana González, Gabriel Francescoli y Arley Camargo por aceptar formar parte del tribunal de esta Tesis.
- A Arley Camargo por la corrección del proyecto de Tesis y sus valiosos aportes.
- A Diana Szteren, Diego y Gael Lercari por prestarnos su casita en Arachania.
- A Javier Vitancurt, Director del área protegido Laguna de Rocha y a los guardaparques Héctor y Daniel, por la disposición e interés que mostraron todo el tiempo, dando una mano siempre que fuera posible.
- A Claudio Borteiro por proporcionarme bibliografía.
- A Walter Norbis por la ayuda en los análisis estadísticos.
- A Valentina Zaffaroni y Michelle Abadie por el asesoramiento en el uso del software WILD-ID.
- A Felipe Lezama por la colaboración en la caracterización vegetal del área de estudio.
- A Ernesto y Claudia por hacer más agradable y llevadera la tediosa tarea de completar planillas.
- A Ceci por ayudarme con las traducciones al inglés.

- A mis vecinos de Laboratorio: Juan, Lara, Anita, Sabrina, Victoria, Martín y María, y también a José Carlos por la buena onda, y por tornar el ambiente de trabajo más ameno.
- A todos los que se sumaron en alguna de las salidas de campo: Ceci, Colo, Eco, Nacho, Fede, Claudia, Vane, Sara, Michelle, Fede G., Gastón, Cecilia Bonilla, Andrea. Muchas gracias por bancarse las lluvias, el calor, el frío, los mosquitos, tantos madrugones y trasnochadas!!
- Quiero agradecer especialmente a Eco, Fede y Colo con los que compartí más horas de campo. Les agradezco sinceramente por toda la dedicación y paciencia, por el trabajo duro y por los momentos de relax donde tan bien la pasamos, jugando algún truquito, compartiendo alguna picadita... por ser mis instructores y copilotos preferidos en mis primeros pasos como conductora en la BLR (aunque se que más de una vez hubieran preferido hacer el trayecto caminando!!!). De verdad sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible!
- A mis colegas y amigos: Ceci, Ale, Colo, Eco, Nacho, Fede, Claudia y Vane... Sin dudas hacen el día a día más divertido!! Gracias por el incentivo permanente, por acompañarme en cada una de las etapas de este trabajo, por bancarme en los días de mal humor y sobre todo por las sugerencias y discusiones que ayudaron a mejorar esta Tesis. Trabajar con ustedes es un placer!
- A Melitta Meneghel por su compañía diaria, por escucharme y darme siempre los mejores consejos.
- A Mariana Beheregaray por los lindos momentos compartidos durante este camino, por las largas charlas y el aliento constante. Al más pequeño, Leo por regalarme tantas sonrisas que sin duda cargan las pilas!!
- A mis amigos: Lore, Guille, Lú, Nacho, Malau, Javi y a mi sobrinita María Paz que viene en camino. Me siento afortunada por tenerlos! Simplemente gracias por estar siempre!
- A mis tíos Margot y Aníbal y a mis primos Fernando y Gonzalo; a Patricia y Juan Martín; y a la Flia Gallego (Susana, Fernando, Andrea, Diego y Federico) por todo el cariño y apoyo constante!

- A mi familia. A mi padre porque desde donde sea que esté me da fuerzas para seguir adelante y ser una mejor persona día a día. A mi madre no tengo palabras para agradecerle tanto amor, tanta paciencia, tanto apoyo incondicional, créeme cuando te digo que sos única!! A mi hermano Alexis y a mi princesa Oriana que a pesar de la distancia los siento tan cerquita, siempre junto a mi en cada paso... A cada uno de ustedes, los amo mucho!
- Finalmente quería agradecerle a Fede, por ser mi sostén, mi compañero... Gracias por toda la ayuda que me brindaste durante estos últimos 2 años y por hacerme los mapas con tanta dedicación! Por bancarme, por compartir el amor por esta profesión y sobre todo por estar siempre para levantarme cuando las cosas se ponen difíciles, por todos los años que caminamos juntos y por los que vendrán, *“Nada como ir juntos a la par”* ...

A TODOS MUCHAS GRACIAS.....

RESUMEN

Melanophryniscus montevidensis (Amphibia, Anura, Bufonidae) es una especie de distribución restringida a la costa de Uruguay (solo se conocen unos pocos registros en el sur de Brasil) que se encuentra amenazada local y globalmente. El objetivo general de esta tesis es aportar información acerca de aspectos de la Historia Natural de esta especie como la reproducción, los patrones de movimientos y el uso del microhábitat reproductivo en La Barra de la Laguna de Rocha, (BLR) Uruguay. Para ello, se realizaron salidas mensuales entre marzo 2012 y febrero 2013 al área de estudio. En el capítulo 1, se analizaron aspectos vinculados con la reproducción de la especie a partir de la observación de machos, hembras y parejas en amplexo durante distintos eventos reproductivos en dos charcos temporales. En el capítulo 2, se describió el microhábitat reproductivo y el uso del mismo que realizan los individuos. Se registraron variables relacionadas con los cuerpos de agua (CDA) y la vegetación del lugar, y parámetros vinculados con el uso del sitio por parte de los anfibios (por ejemplo: distancia al borde del charco, profundidad del agua y uso de la vegetación). Se observaron los comportamientos exhibidos por machos, hembras y parejas en amplexo durante la reproducción. En el capítulo 3, se estudiaron los movimientos de los individuos entre cinco sitios en la BLR, utilizando la fotoidentificación (FI) asistida por software para el reconocimiento individual. Esta técnica no invasiva, consiste en registrar fotográficamente patrones de diseño-coloración únicos para cada animal. También se analizó la razón de sexos en la población y se exploró la correlación entre la actividad de los individuos y las variables climáticas. La FI resultó ser una herramienta útil para individualizar ejemplares de *M. montevidensis*. La distancia recorrida por los individuos se relacionó con la humedad climática y con el tamaño corporal. Los resultados refuerzan la idea de que la especie presenta reproducción explosiva. Esta actividad está asociada con las lluvias, y tiene lugar en CDA temporales poco profundos, con abundante vegetación hidrófila (utilizada tanto para sujeción durante la vocalización y el amplexo, como para el soporte de los huevos). Los individuos se encontraron con mayor frecuencia en zonas próximas al borde del charco con vegetación más densa. Las vocalizaciones se extendieron a altas horas de la noche. Los machos fueron más abundantes que las hembras, y recurrieron a tácticas activas para obtener pareja como la búsqueda de hembras y el desplazamiento de machos en amplexo. Machos vocalizadores estuvieron más cerca del borde del charco y presentaron una mejor condición corporal en relación con los no vocalizadores. La especie presenta dimorfismo sexual, con hembras más grandes y pesadas que los machos. No se encontró asociación entre el tamaño de la hembra y la fecundidad o el tamaño de los huevos. Esto concuerda con su dinámica reproductiva, ya que las hembras deben estar preparadas todo el año para reproducirse siendo más ventajoso invertir energía en la reproducción en lugar de priorizar el crecimiento. Los resultados revelarían una cierta fidelidad de sitio (reproductivo y de refugio). Dado que aún no se ha definido el Plan de Manejo para el Paisaje Protegido Laguna de Rocha, el conocimiento de los movimientos, patrones de actividad reproductiva y uso de los microhábitats de reproducción de *M. montevidensis* derivados de esta Tesis, podrían ser clave para proponer estrategias de conservación *in situ* adecuadas y eficientes.

ABSTRACT

Melanophryniscus montevidensis (Amphibia, Anura, Bufonidae) is a species whose geographical distribution is restricted to the Uruguayan coasts (only a few records are known in southern Brazil). This species is locally and globally threatened. The aim of this thesis is to provide natural history information of this species, such as breeding pattern, movements and the use of reproductive microhabitat in Barra de la Laguna de Rocha (BLR), Uruguay. For this, monthly field trips were carried out between march 2012 and february 2013. In the first chapter reproductive traits of the species were analyzed, based on the temporal observation of males, females and amplexant pairs during breeding events in two temporal ponds. The second chapter describes the breeding microhabitat and the microhabitat use of the specimens. Variables of the water bodies and their vegetation were recorded, as much as those related with the site use of the specimens (e.g.: distance to the edge of the pond, water depth and vegetation use). The behavior exhibited by individuals and amplexant pairs during the breeding events were also recorded. In the third chapter, movement of the individuals was studied between five zones within BLR, using the photoidentification (PI), supported by computer software, for individual recognition. This non invasive technique consists in the photographic recording of the unique color-design pattern of every individual. The sex-ratio of the population and the correlation between the weather conditions and the activity patterns were also analyzed. PI techniques demonstrated to be useful tools for individual identification of *M. montevidensis* specimens. The travelled distance was associated to the humidity and body size. The results of this study reinforce the idea that the species is an explosive breeder. This activity is associated to rainfalls and occurs in shallow temporary water bodies with abundant hydrophilic vegetation. This vegetation is used both for subjection during vocalization and amplexus, as for attach egg-masses. Individuals were more frequently found in areas near the border of the pond with more dense vegetation. The vocalization activity extended up to late at night. Males were always more abundant than females. They tended to adopt alternative tactics to find couples, such as active search of females and aggressive behaviour of male displacing. The calling males were found closer to the border of the pond and show better body condition than the non calling males. This species shows sexual dimorphism, being females larger and heavier than males. No association was found between female size and fecundity or eggs size. This is consistent with the explosive breeding dynamics, as females must be prepared all year long for breeding, instead of prioritizing growth. The results would reveal the fidelity of the animals to breeding and refuge sites. Since the Management Plan of the Protected Area "Paisaje Protegido Laguna de Rocha" has not yet been defined, knowledge about movements, breeding patterns, microhabitat use during reproduction of *M. montevidensis* provided by this thesis, could be key information to propose suitable and efficient *in situ* conservation measures for this species.

INTRODUCCION GENERAL

Los anfibios son vertebrados tetrápodos pertenecientes a la Clase Amphibia (Phylum: Chordata). El término “anfibio” significa doble (*Amphi*) vida (*Bios*) y hace referencia al ciclo de vida bifásico (parte en agua y parte en tierra), que presentan muchos de los miembros de este grupo (Stebbins & Cohen, 2005). Esto se debe a que la mayoría de las especies poseen larvas acuáticas (respiración branquial, carencia de miembros locomotores), mientras que los adultos generalmente son terrestres (respiración pulmonar, miembros anteriores y posteriores desarrollados) (Wells, 2007). Esta transición se da a través del proceso de Metamorfosis, donde las larvas sufren una serie de cambios que involucran transformaciones estructurales, fisiológicas, bioquímicas y comportamentales, completando así su desarrollo para dar lugar a un individuo juvenil de aspecto similar al adulto (Stebbins & Cohen, 2005).

Todos los anfibios vivientes se encuentran agrupados en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Urodela (salamandras, tritones y axolotes) y Gymnophiona (cecilias). Estos tres grupos descienden de un grupo de tetrápodos que apareció por primera vez en el período Devónico hace unos 400 m.a (Wells, 2007). En la actualidad existen 7189 especies conocidas (Frost, 2014). Este número ha crecido enormemente en los últimos años, desde 1985 se ha incrementado en más de un 60% (Stuart *et al.*, 2008). El orden Anura es el más diverso con 6319 especies conocidas; seguido de Urodela, con 671 especies y finalmente Gymnophiona con 199 especies (Frost, 2014). Los anuros en la etapa adulta presentan miembros locomotores desarrollados y carecen de cola. Los Urodelos también presentan al menos un par de miembros en estado adulto pero tienen cola. A diferencia de los anteriores, las cecilias carecen de miembros locomotores y se encuentran adaptadas a la vida fosorial (Duellman & Trueb, 1994).

A pesar de las diferencias morfológicas entre los grupos, todos los anfibios comparten determinadas características fisiológicas que en conjunto los separan de otros vertebrados terrestres. Son animales ectodermos, cuya temperatura corporal depende de la del medio ya que no poseen mecanismos fisiológicos para regularla. En consecuencia, tienen tasas metabólicas mucho más bajas que aves y mamíferos endotérmicos. Otra de las características distintivas de este grupo es la presencia de una piel delgada y desnuda,

altamente permeable que les impide vivir en agua salada o estar activos en ambientes muy secos, pero permite el intercambio gaseoso (a mayor grado que cualquier otro vertebrado) y cumple un rol importante en el mantenimiento de una temperatura corporal constante (Wells, 2007). Finalmente, cabe destacar que la mayoría de los anfibios son dependientes del agua para la actividad reproductiva ya que presentan huevos “anamniotas”. Estos carecen de anexos embrionarios que impidan su desecación, y en consecuencia deben ser depositados en sitios húmedos o en cuerpos de agua (Stebbins & Cohen, 2005; Wells, 2007).

Crisis Global de la Biodiversidad: la situación de los anfibios

Actualmente, los anfibios (especialmente los anuros) constituyen el grupo zoológico con más problemas de conservación a nivel mundial, experimentando una disminución global masiva en sus poblaciones (Stuart *et al.*, 2004, 2008; Collins & Crump, 2009). Este evento forma parte de la “Crisis Global de la Biodiversidad” la cual se ve reflejada en la rápida y acelerada pérdida de especies y hábitats a nivel global. La magnitud de esta crisis es tan grande que podría eventualmente superar algunas de las grandes extinciones masivas ocurridas en el pasado (Collins & Crump, 2009). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en su última actualización de las Listas Rojas de las especies amenazadas realizada en julio 2013, plantea que de 6411 spp de anfibios evaluadas, 36 estarían extintas (2 en estado salvaje), 519 en peligro crítico, 773 en peligro y 656 serían vulnerables, conformando un total de 1948 spp amenazadas (IUCN, 2013). Considerando estas cifras, este sería el grupo con mayor frecuencia de especies comprometidas (30%), seguido por los mamíferos con un 20% y las aves con un 13% (IUCN, 2014). En nuestro continente, esta situación es preocupante ya que alberga el 50% de la diversidad mundial de anfibios (de Sá, 2005). Entre las principales amenazas podemos encontrar: cambio en el uso del suelo, sobreexplotación comercial, especies introducidas, contaminantes ambientales, cambio climático global y enfermedades infecciosas emergentes (Stuart *et al.*, 2008; Collins & Crump, 2009). Los anfibios como grupo son especialmente vulnerables a causa de varias de sus características; entre éstas se destacan: su tamaño relativamente pequeño, su fisiología ectotérmica, su piel

permeable (permite la entrada de diversos agentes químicos o biológicos) y su dependencia de hábitats acuáticos o húmedos (Wells, 2007).

De las 48 especies autóctonas de anfibios del Uruguay, 13 se encuentran en alguna categoría de amenaza (1 vulnerable, 5 en peligro, 7 en peligro crítico) (Maneyro & Carreira, 2012). Las posibles causas que afectan el estado de conservación de los anfibios en Uruguay varían de acuerdo a la especie y a la localidad, y son principalmente: la creciente urbanización (sobre todo costera), destrucción y fragmentación del hábitat, contaminación ambiental y quitridiomicosis, entre otras (Canavero *et al.*, 2010). Esta enfermedad causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* fue descrita por primera vez en Uruguay para *Lithobates catesbeianus* (Mazzoni *et al.*, 2003); luego se detectó en larvas silvestres de especies autóctonas (Borteiro *et al.*, 2009), y recientemente en adultos silvestres de *Pleurodema bibroni* (Anura: Leiuperidae) (Bardier *et al.*, 2011).

Fauna de Anfibios de Uruguay. El género *Melanophryniscus* Gallardo 1961 y *Melanophryniscus montevidensis*.

En Uruguay actualmente hay descritas 49 especies de anfibios. El orden Gymnophiona está representado por una única especie perteneciente a la familia Caeciliidae (*Chthonerpeton indistinctum*) (Maneyro & Carreira, 2012). El orden Anura se encuentra representado en el país por 8 familias: Alsodidae (1 género, 1 sp); Bufonidae (2 géneros, 11 spp); Ceratophryidae (1 género, 1 sp); Hylidae (7 géneros, 16 spp); Leptodactylidae (4 géneros, 15 spp); Microhylidae (1 género, 1 sp); Odontophrynidae (1 género, 2 spp) y la introducida Ranidae (1 género, 1sp) (Frost, 2014). Esta última familia esta representada por la especie *Lithobates catesbeianus*, mejor conocida como “Rana toro”, una especie exótica invasora originaria de América del Norte (Maneyro & Carreira, 2012). En Uruguay no existen representantes silvestres del orden Urodela.

El género *Melanophryniscus* pertenece a la familia Bufonidae y en la actualidad está compuesto por 26 especies (Frost, 2014) distribuidas en el sur de Brasil, sur de Bolivia, Paraguay, Uruguay, y en el centro y norte de Argentina (Maneyro *et al.*, 2008). Se trata de un género basal, siendo uno de los más antiguos de la familia Bufonidae (Pramuk *et al.*, 2008). En Uruguay está representado por seis especies que se dividen dentro de

tres grupos en base a la morfología externa: grupo de *M. stelzneri* (compuesto por *M. montevidensis* y *M. atroluteus*); grupo de *M. moreirae* (compuesto por *M. langonei* y *M. sanmartini*) y finalmente el grupo de *M. tumifrons* (compuesto por *M. devincenzii* y *M. pachyrhynus*) (Maneyro & Kwet, 2008). Dos de ellas se encuentran amenazadas (En Peligro (EN)) a nivel local: *M. devincenzii* y *M. montevidensis*. Por otra parte, *M. sanmartini* se encuentra casi amenazada (NT), *M. pachyrhynus* es insuficientemente conocida (DD), *M. langonei* no ha sido evaluada (NE) y *M. atroluteus* no se encuentra en peligro (LC) (Maneyro & Carreira, 2012). Adicionalmente, tres de estas especies están catalogadas como amenazadas a nivel mundial: *M. devincenzii* (EN) (Lavilla *et al.*, 2004), *M. langonei* (Críticamente Amenazado (CR)) (Maneyro & Angulo, 2009) y *M. montevidensis* (Vulnerable (VU)) (Langone, 2004). Recientemente, *M. montevidensis* ha sido considerada como una especie prioritaria para la conservación en Uruguay (Arrieta *et al.*, 2013). En general, los miembros del género *Melanophryniscus* presentan una coloración llamativa (dorso negro o marrón oscuro, vientre manchado de rojo amarillo o naranja) (Langone, 2002); pequeño tamaño (<30mm); actividad principalmente diurna; son reproductores estacionales y no estacionales (Van Sluys & Guido-Castro, 2011) y poseen un rápido proceso de metamorfosis (Langone, 2002). Cuando se ven amenazados realizan un comportamiento defensivo llamado “Unkenreflex”, el cual consiste en mostrar a los predadores la coloración conspicua del vientre, las palmas de las manos y la planta de los pies (Toledo & Haddad, 2009); también se destaca la presencia de alcaloides tóxicos en su piel (Mebis *et al.*, 2005).

Melanophryniscus montevidensis (Philippi, 1902), conocido como “Sapito de Darwin”, se distribuye en la costa Atlántica de Uruguay y una pequeña parte de la costa sureste de Brasil (Toranza & Maneyro, 2013) (Fig. 1). Habita principalmente zonas arenosas costeras y se asocia a cuerpos de agua estacionales y temporales (Maneyro & Carreira, 2012). Es un animal diurno, con reproducción del tipo explosiva, la cual se encuentra asociada a fuertes precipitaciones y ocurre en charcos temporarios poco profundos, donde se desarrollan posteriormente las larvas (Langone, 2002, 2004). La larva fue descrita por Garrido (1989), destacándose la presencia de queratodontes simples bien desarrollados con extremos romos, y una fórmula dentaria 2/3 durante todo el

proceso de metamorfosis. Los posmetamorfos dorsalmente presentan una coloración negra con manchas amarillas y ventralmente son negros, con manchas rojas y amarillas (Achaval & Olmos, 2007) (Fig. 2). Las palmas de las manos y las plantas de los pies son de color rojo (Fig. 2). Se alimentan básicamente de hormigas, pero también consumen termitas, pulgones, colémbolos y pequeños grillos (Mebis *et al.*, 2005; Achaval & Olmos, 2007). Cuando se ven amenazados exhiben el comportamiento de “Unkenreflex” (Fig. 2) y también poseen secreciones cutáneas con distintos tipos de alcaloides como pumiliotoxinas e hidroquinonas (Mebis *et al.*, 2005). En los últimos 15 años la franja costera que va desde el Arroyo Carrasco hacia el este ha experimentado un rápido proceso de urbanización provocando la desaparición de *M. montevidensis* de lugares donde hace unos años era muy común encontrarla (Maneyro & Langone, 2001).



FIGURA 1. Distribución de *Melanophryniscus montevidensis*. Imagen extraída y modificada de AmphibiaWeb, 2014 (<http://amphibiaweb.org/>).



FIGURA 2. Individuo de *Melanophryniscus montevidensis* exhibiendo el comportamiento defensivo de “Unkenreflex”. Se puede apreciar la coloración general negra, algunas de las manchas amarillas del vientre y dorso y las palmas de las manos y pies de color rojo.

Marco teórico

La condición ectotérmica y la piel permeable de los anfibios, determinan la existencia de una fuerte relación entre las variables ambientales y su biología (Guimarães *et al.*, 2011; Van Sluys & Guido-Castro, 2011). En consecuencia los patrones de actividad reproductiva son continuos en climas no estacionales tropicales, y cíclicos en regiones tropicales y templadas que tienen algún tipo de estacionalidad (Camargo *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005). El aumento de la temperatura en regiones templadas estimula la gametogénesis y regula la duración de la estación reproductiva (Jørgensen, 1986) mientras que la precipitación podría accionar el inicio del evento reproductivo (Stebbins & Cohen, 1995). No obstante, existen factores intrínsecos (por ej: ritmos internos, cambios ontogénicos) que también intervienen en la reproducción (Both *et al.*, 2008). La investigación de estos patrones de actividad es una herramienta básica en la comprensión de las estrategias reproductivas adoptadas por los anuros.

Wells (1977) reconoce dos estrategias reproductivas temporales en base a la extensión del período de actividad: explosiva (horas o días) y prolongada (varias semanas o meses). En especies con reproducción prolongada, las hembras llegan asincrónicamente al sitio reproductivo y existe una selección positiva hacia determinado tipo de machos. En especies explosivas ocurre un arribo sincrónico de ambos sexos al cuerpo de agua donde se produce el evento reproductivo y se da la formación de coros (Wells, 1977). El alto grado de sincronía tiende a generar densas congregaciones en los sitios reproductivos, y se espera que la competencia entre los machos para acceder a las hembras sea más

importante que el potencial de elección por parte de las mismas (Cairo *et al.*, 2013). Los patrones temporales antes descritos influyen en las tácticas comportamentales de obtención de pareja adoptadas por la población. Los machos de las especies con dinámica reproductiva explosiva generalmente utilizan estrategias alternativas de “macho desplazador” (un macho intenta expulsar a otro macho que se encuentra en amplexo para robarle a la hembra), y de “búsqueda activa de hembras” (machos dejan de vocalizar y se comienza a mover por el ambiente buscando activamente hembras gravidas) (Pombal & Haddad, 2005). Por otra parte, los que exhiben reproducción prolongada optan por la estrategia de “macho satélite”, donde un macho que no vocaliza se asocia a otro vocalizador, para interceptar o robarle a las hembras que se aproximan a él, o simplemente para esperar que deje libre el territorio (Pombal & Haddad, 2005).

Las vocalizaciones y los mecanismos de obtención de pareja, son actividades que implican un alto costo energético para los machos (Wells, 2007). En hembras, el costo de la actividad reproductiva se puede medir a partir de la Inversión reproductiva, resultado de la combinación entre el número de puestas y la inversión en cada huevo (Pupin *et al.*, 2010). Esta inversión es afectada por las condiciones de las hembras, particularmente por la cantidad de energía almacenada en cuerpos grasos (CG) (Castellano *et al.*, 2004). Trabajos previos han reportado una relación inversa entre la abundancia de los CG y el desarrollo gonadal, sugiriendo que estas estructuras son fuente de energía usada para la reproducción (Díaz-Paéz & Ortiz, 2001; Pereira & Maneyro, 2012). Diversos estudios encontraron que independientemente del patrón reproductivo, en hembras generalmente existe una correlación positiva entre el número de oocitos y el tamaño corporal (Rodrigues *et al.*, 2003; 2004, Camargo *et al.*, 2005, 2008; Maneyro *et al.*, 2008; Pereira & Maneyro, 2012), por lo cual las más grandes tendrían mayor fitness (Prado & Haddad, 2005). Esta relación, es uno de los factores propuestos para entender el dimorfismo sexual en el tamaño a favor de las hembras que ocurre en el 90% de las especies de anuros (Shine, 1979). La selección sexual es otra de las principales causas sugeridas para explicar este fenómeno (Woolbright, 1983); no obstante aspectos demográficos como por ejemplo diferencias en la estructura de edades entre los sexos en la población reproductiva,

pueden ser muy importantes (Monnet & Cherry, 2002; Gramapurohit *et al.*, 2004; Vargas-Salinas, 2006).

Es importante conocer el uso de sitios reproductivos por los anuros para su gestión y conservación. Varios estudios han reportado que la presencia y abundancia de anuros en los lugares de reproducción depende fuertemente de un conjunto de características abióticas y bióticas (Lemckert & Mahony, 2010). Dentro del primer grupo se encuentran la profundidad, temperatura y calidad del agua, el hidropériodo, el tamaño de los cuerpos de agua, la cantidad de vegetación emergente y el tipo/grado de cobertura vegetal en el suelo circundante. La cantidad de vegetación en los sitios reproductivos puede generar microhábitats complejos dentro de los charcos que podrían proporcionar refugios para las larvas y metamorfos frente a peces y otros posibles depredadores, así como alimento para las larvas (Lane *et al.*, 2007; Pereyra *et al.*, 2011). En este sentido, Kopp *et al.*, 2006 encontraron un aumento de la supervivencia de las larvas en microhábitats con vegetación, lo cual atribuyeron a una disminución en la eficacia de los depredadores en la búsqueda y captura de las larvas en estos microhábitats. Adicionalmente en *Melanophryniscus stelzneri* la proporción de la vegetación que cubre la superficie del espejo de agua y la que rodea el charco se correlacionó positivamente con el uso del sitio reproductivo, lo que demuestra que estos animales prefieren los sitios de desove con densa vegetación en el interior del cuerpo de agua (Pereyra *et al.*, 2011). Finalmente, entre los principales factores bióticos influyentes se distinguen la presencia de depredadores y competidores (Lane *et al.*, 2007; Pereyra *et al.*, 2011).

A pesar de que recursos importantes del hábitat para los anfibios, como los sitios de reproducción o alimentación, están separados en espacio y tiempo, éstos no son animales muy vágiles en comparación con algunos vertebrados terrestres (Sinsch, 1988). En general, presentan un patrón de movimiento típico con muchos movimientos cortos y pocos largos (Wells & Wells, 1976), una baja capacidad de dispersión y una alta fidelidad de sitio (Smith & Green, 2005; Caldwell & Shepard, 2007). A causa de sus restricciones fisiológicas, los movimientos son mayores durante los días lluviosos o húmedos (Husté *et al.*, 2006) y usualmente se producen de noche, cuando la humedad es más alta (Vitt & Caldwell, 2009; Santos & Grant, 2011). Durante el día se refugian en lugares sombreados y

húmedos evitando las temperaturas extremas (Tozetti & Toledo, 2005; Yu *et al.*, 2010). Por otra parte, dentro de una especie, grandes tamaños corporales permiten mayores distancias de movimiento (Lemckert, 2004; Tozetti & Toledo, 2005). Esto se debe a que individuos más pequeños tienen menor capacidad locomotora y son propensos a perder el agua más rápidamente, por lo tanto, recorren distancias más cortas (Semlitsch, 2008). Las distancias recorridas también pueden variar en función de las estaciones del año, las estrategias de forrajeo, la edad y el sexo de los individuos (Tozetti & Toledo, 2005). Posiblemente los movimientos de los anfibios más comúnmente reconocidos son las migraciones estacionales hacia y desde sitios reproductivos (Semlitsch, 2008). Estos desplazamientos rara vez exceden unos pocos cientos de metros, no obstante, algunas especies pueden recorrer grandes distancias desde el lugar de refugio hasta su sitio de reproducción (Stuart *et al.*, 2008).

Presentación de la Tesis

La presente tesis de Maestría se titula: **“Biología reproductiva, movimientos y uso de microhábitat en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay”**; y se encuentra estructurada en tres capítulos. El objetivo general de la misma es obtener información acerca de aspectos de la Historia Natural de *M. montevidensis* como la biología reproductiva, los patrones de movimientos y el uso del microhábitat de vocalización, amplexo y desove en La Barra de la Laguna de Rocha, Uruguay. Este lugar forma parte del Paisaje Protegido Laguna de Rocha del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Como se mencionó anteriormente la especie se encuentra amenazada en el Uruguay y la sola inclusión dentro del área protegida no asegura su conservación, sino que se requiere de la aplicación de medidas específicas para lograr una estabilidad poblacional. Dado que aún no se ha definido el Plan de Manejo para el Paisaje Protegido Laguna de Rocha, el conocimiento de los patrones de actividad reproductiva, uso de los microhábitats de reproducción y movimientos de *M. montevidensis* derivados de esta Tesis, podrían contribuir en la elaboración e implementación de estrategias concretas de conservación para la especie en el área.

En el capítulo 1: **“Patrones de actividad reproductiva en una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae)”**, se analizan diversos aspectos vinculados con la reproducción de esta especie a partir de la observación de machos, hembras y parejas en amplexo en cuerpos de agua temporales seleccionados en La Barra de la Laguna de Rocha, durante distintos eventos reproductivos. En el capítulo 2: **“Caracterización y uso del microhábitat reproductivo en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) en la Barra de la Laguna de Rocha, Uruguay”**, se describe el microhábitat reproductivo y el uso del mismo que realizan los individuos de la especie. Para ello se registraron variables relacionadas con los cuerpos de agua y la vegetación del lugar, y parámetros vinculados con el uso del cuerpo de agua por parte de los anfibios (por ejemplo: distancia al borde del charco, profundidad del agua, uso de la vegetación sumergida y emergente, etc). También se estudiaron los principales comportamientos exhibidos por los machos, hembras y parejas en amplexo durante la actividad reproductiva. En el capítulo 3 titulado: **“Análisis de los movimientos en una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) utilizando la fotoidentificación para el reconocimiento individual”**, se estudian los movimientos de los individuos de la especie a lo largo de un año, entre cinco sitios seleccionados en la Barra de la Laguna de Rocha, utilizando la fotoidentificación asistida por software (a partir del patrón de coloración ventral de cada animal) para el reconocimiento individual. Adicionalmente se analiza la proporción de sexos en la población y se estudia la correlación entre la actividad de los individuos y las variables climáticas. En la sección **CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS** se resumen las principales conclusiones derivadas de esta tesis y las perspectivas de trabajo. Por último se encuentran tres anexos. En el Anexo 1 se presenta una descripción completa del área de estudio; en el Anexo 2 se encuentran imágenes de los sitios de muestreo seleccionados y por último en el Anexo 3 se adjunta el artículo titulado: **“Validez de la técnica de fotoidentificación con marcas naturales en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae)”**, el que será sometido a la revista *Phyllomedusa*.

BIBLIOGRAFÍA

- Achaval, F. & Olmos, A. 2007. Anfibios y reptiles del Uruguay. Tercera edición. Graphis: Montevideo.
- Afonso, L. G. & Eterovick, P. C. 2007. Microhabitat choice and differential use by anurans in forest streams in southeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 41: 937-948.
- Arrieta A., Borteiro, C., Kolenc, F. & Langone, J. A. 2013. Anfibios. Pp. 113-127, en: Soutullo, A., Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J. A (eds.). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. snap/dinama/mvotma y dicyt/mec, Montevideo.
- Bardier, C., Ghirardi, R., Levy, M. & Maneyro, R. 2011. First Case of Chytridiomycosis in an Adult Specimen of a Native Anuran from Uruguay. *Herpetological Review*, 42: 65-66.
- Borteiro, C., Cruz, J., Kolenc, F. & Aramburu, A. 2009. Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84: 159-162.
- Both, C., Kaefer, I. L., Santos, T. G. & Cechin, S. T. Z. 2008. An Austral anuran assemblage in the Neotropics: Seasonal occurrence correlated with photoperiod. *Journal of Natural History*, 42: 205-222.
- Cairo, S. L., Zalba, S.M. & Úbeda, C. A. 2013. Reproductive pattern in the southernmost populations of South American redbelly toads. *Journal of Natural History*, 47: 2125-2134.
- Caldwell, J. P. & Shepard, D. B. 2007. Calling site fidelity and call structure of a neotropical toad, *Rhinella ocellata* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 41: 611-621.
- Camargo, A., Sarroca, M. & Maneyro, R. 2008. Reproductive effort and the egg number vs. size trade-off in *Physalaemus frogs* (Anura: Leiuperidae). *Acta Oecologica*, 34: 163-171.
- Camargo, A., Naya, D. E., Canavero, A., da Rosa, I. & Maneyro, R. 2005. Seasonal activity and the body size-fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. *Annales Zoologici Fennici*, 42: 513-521.

- Canavero, A., Carreira, S., Langone, J. A., Achaval, F., Borteiro, C., Camargo, A., da Rosa, I., Estrades, A., Fallabrino, A., Kolenc, F., López-Mendilaharsu, M. M., Maneyro, R., Meneghel, M., Nuñez, D., Prigione, C. M. & Ziegler, L. 2010. Conservation status assessment of the amphibians and reptiles of Uruguay. *Iheringia (Série Zoologia)*, 100: 5-12.
- Castellano, S., Cucco, M. & Giacoma, C. 2004. Reproductive investment of female Green Toads (*Bufo viridis*). *Copeia*, 2004: 659-664.
- Collins, J. P. & Crump, M. L. 2009. Extinction in our times. Global amphibian decline. Oxford University Press.
- De Sá, R. O. 2005. Crisis global de Biodiversidad: importancia de la diversidad genética y la extinción de anfibios. *Agrociencia*, 9: 513-522.
- Díaz-Paéz, H. & Ortiz, J. C. 2001. The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. *Amphibia-Reptilia*, 22: 431-445.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. 1994. Biology of amphibians. New York: McGraw Hill.
- Frost, D. R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (22 Jan. 2014). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garrido, R. R. 1989. Descripción de la larva de *Melanophryniscus stelzneri montevidensis* (Philippi, 1902) (Anura: Bufonidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica de Uruguay (Segunda Época)*, 5: 7-8.
- Gramapurohit, N. P., Bhagyashri A. S. & Saidapur, S. K. 2004. Growth, Sexual Maturation and Body Size Dimorphism in the Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daud.). *Herpetologica*, 60: 414-419.
- Guimarães, T. C. S., de Figuereido, G. B., Mesquita, D. O. & Vasconcellos, M. M. 2011. Ecology of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a Neotropical Savanna. *Journal of Herpetology*, 45: 244-250.
- Husté, A., Clobert, J. & Miaud, C. 2006. The movements and breeding site fidelity of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in an urban park near Paris (France) with management recommendations. *Amphibia-Reptilia*, 27: 561-568.

- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Disponible en: www.iucnredlist.org. Último acceso: 22 de enero de 2014.
- Jørgensen, C. B. 1986. External and internal control of patterns of feeding, growth and gonadal function in a temperate zone anuran, the toad *Bufo bufo*. *Journal of Zoology*, 216: 211-241.
- Lane, S. J., Hamer, A. J. & Mahony, M. J. 2007. Habitat correlates of five amphibian species and of species-richness in a wetland system in New South Wales, Australia. *Applied Herpetology*, 4: 65-82.
- Langone, J. 2002. *Melanophryniscus*, interesantes sapitos uruguayos. Documentos de Divulgación. *Museo Nacional de Historia Natural y Antropología*, 4: 1-11.
- Langone, J. 2004. *Melanophryniscus montevidensis*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Disponible en: www.iucnredlist.org. Último acceso: 31 de enero de 2014.
- Lavilla, E.; Baldo, D. & J. Langone 2004. *Melanophryniscus devincenzii*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Disponible en: www.iucnredlist.org. Último acceso: 31 de enero de 2014.
- Lickers, F. L. 2004. Variations in anuran movements and habitat use: implications for conservation. *Applied Herpetology*, 1: 165-181.
- Lemckert, F. & Mahony, M. 2010. The relationship among multiple-scale habitat variables and pond use by anurans in northern New South Wales, Australia. *Herpetological Conservation and Biology*, 5: 537-547.
- Maneyro, R. & Angulo, A. 2009. *Melanophryniscus langonei*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Disponible en: www.iucnredlist.org. Último acceso: 31 de enero de 2014.
- Maneyro, R. & Carreira, S. 2012. Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la fuga, Montevideo.
- Maneyro, R. & Kwet, A. 2008. Amphibians in the border region between Uruguay and Brazil: updated species list with comment on taxonomy and natural history (Part I: Bufonidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde (N.S)*, 1: 95-121.

- Maneyro, R. & Langone, J. A. 2001. Categorización de los Anfibios del Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, 15: 107-118.
- Maneyro, R., Naya, D. E. & Baldo, D. 2008. A new species of *Melanophryniscus* (Anura, Bufonidae) from Uruguay. *Iheringia (Série Zoologia)*, 98: 189-192.
- Mazzoni, R., Cunningham, A. A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E. & Speranza, G. 2003. Emerging pathogen of amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 995-998.
- Mebs, D., Pogoda, W., Maneyro, R. & Kwet, A. 2005. Studies on the poisonous secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon*, 46: 641-650.
- Monnet, J. M. & Cherry, M. I. 2002. Sexual size dimorphism in anurans. *Proceedings of the Royal Society B*, 269: 2301-2307.
- Pereira, G. & Maneyro, R. 2012. Size-fecundity relationships and reproductive investment in females of *Physalaemus riograndensis* Milstead, 1960 (Anura, Leiuperidae) in Uruguay. *The Herpetological Journal*, 22: 145-150
- Pereyra, L. C., Lescano, J. N. & Leynaud, G. C. 2011. Breeding-site selection by red-belly toads, *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae), in Sierras of Córdoba, Argentina. *Amphibia-Reptilia*, 32: 105-112.
- Pombal, J. P. Jr. & Haddad, C. F. B. 2005. Estratégias e modos reprodutivos em anuros. En: Nascimento, L. B. & Oliveira, M. E (Eds.). *Herpetologia do Brasil II* (pp. 101-116). Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- Prado, C. P. A. & Haddad, C. F. B. 2005. Size-fecundity relationship and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, South-Western Brazil. *Herpetological Journal*, 15: 181-189.
- Pramuk, J. B., Robertson, T., Sites Jr, J. W. & Noonan, B. P. 2008. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography*, 17: 72-83.
- Pupin, N. C., Gasparini, J. L., Bastos, R. P., Haddad, C. F. B. & Prado, C. P. A. 2010. Reproductive biology of an endemic *Physalaemus* of the Brazilian Atlantic forest,

- and the trade off between clutch and egg size in terrestrial breeders of the *P. signifer* group. *Herpetological Journal*, 20: 147-156.
- Rodrigues, D. J., Lopes, F. S. & Uetanabaro, M. 2003. Padrão reprodutivo de *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia (Série Zoologia)*, 93: 365-371.
- Rodrigues, D. De J., Uetanabaro, M. & Lopes, F. 2004. Reproductive strategies of *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) and *P. albonotatus* (Steindachner, 1864) at Serra da Bodoquena, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Española de Herpetología*, 18: 63-73.
- Santos, R. R. & Grant, T. 2011. Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evolutionary Ecology*, 25: 249-258.
- Semlitsch, R. D. 2008. Differentiating Migration and Dispersal Processes for Pond-Breeding Amphibians. *The Journal of Wildlife Management*, 72: 260-267.
- Shine, R. 1979: Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*, 2: 297-306.
- Sinsch, U. 1988. Seasonal changes in the migratory behavior of the toad *Bufo bufo*, direction and magnitude of movements. *Oecologia*, 76: 390-398.
- Smith, M. A. & Green, D. M. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, 28: 110-128.
- Stebbins, R. C. & Cohen, N. W. 1995. A natural history of Amphibians. Princeton University Press, New Jersey.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L. & Waller, R. W. 2004. Status and trends of Amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.
- Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P. & Young, B. E. 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; and Conservation International, Arlington, Virginia, USA.

- Toledo, L. F. & Haddad, C. F. B. 2009. Colors and some morphological traits as defensive mechanisms in Anurans. *International Journal of Zoology*, 910892: 1-12.
- Toranza, C. & Maneyro, R. 2013. Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa*, 12: 97-106.
- Tozetti, A. M. & Toledo, L. F. 2005. Short-term movement and retreat sites of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) during the breeding season: a spool-and-line tracking study. *Journal of Herpetology*, 39: 640-644.
- Van Sluys, M. & Guido-Castro, P. 2011. Influence of temperature and photoperiod on the activity of *Melanophryniscus moreirae* (Miranda-Ribero 1920) (Anura: Bufonidae) on the Itatiaia Plateau, southeastern Brazil. *South American Journal of Hepetology*, 6: 43-48.
- Vargas-Salinas, F. 2006. Sexual size dimorphism in the Cuban treefrog *Osteopilus septentrionalis*. *Amphibia-Reptilia*, 27: 419-426.
- Vasconcelos, T. & Rossa-Feres, D. 2008. Habitat Heterogeneity and Use of Physical and Acoustic Space in Anuran Communities in Southeastern Brazil. *Phyllomedusa*, 7: 127-142.
- Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. 2009. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Third Edition. Academic Press, Burlington, Massachusetts.
- Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25: 666-693.
- Wells, K.D. 2007. The ecology and behavior of Amphibians. The University of Chicago Press.
- Wells, K. D. & Wells, R. A. 1976. Patterns of movement in a population of the slimy salamander, *Plethodon glutinosus*, with observations on aggregations. *Herpetologica*, 32: 156-162.
- Woolbright, L. L. 1983. Sexual selection and size dimorphism in anuran Amphibia. *The American Naturalist*, 121: 110-119.
- Yu, T., Guo, Y. & Lu, X. 2010. Habitat selection of Asiatic toad, *Bufo gargarizans* (Cantor, 1842), in southwestern China. *Russian Journal of Ecology*, 41: 192-196.

CAPÍTULO 1. “Patrones de actividad reproductiva en una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae)”

INTRODUCCIÓN

Las características fisiológicas particulares de los anfibios (ver Introducción General), determinan la existencia de una fuerte relación entre las variables ambientales y su biología (Guimarães *et al.*, 2011). Los factores climáticos juegan un rol clave en los patrones de actividad y reproducción en estos animales (Duellman & Trueb, 1994; Saenz *et al.*, 2006). En este sentido, en las regiones tropicales los anuros tienden a exhibir ciclos reproductivos continuos, pero se reproducen en la temporada donde los niveles de precipitación propician sitios de oviposición adecuados (Toledo *et al.*, 2003; Ávila & Ferreira, 2004; Prado & Haddad, 2005). En cambio, en zonas templadas, la actividad reproductiva depende tanto de la temperatura como de las precipitaciones, siendo generalmente cíclica (Camargo *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Canavero *et al.*, 2008). Este patrón estacional es evidente en el ciclo anual de las gónadas, con alternancia entre períodos de actividad y reposo (Jørgensen, 1992). La existencia de variación mensual en la longitud hocico-cloaca en poblaciones de anuros de zonas templadas también sería un indicador de variación estacional en la actividad reproductiva (Camargo *et al.*, 2005; Pereira & Maneyro, 2012). Cabe destacar que existen factores intrínsecos (por ej: ritmos internos) que también intervienen en la reproducción (Both *et al.*, 2008).

Adicionalmente, en anuros se reconocen dos patrones temporales de comportamiento reproductivo en base a la extensión del período de actividad: explosivo (horas o días) y prolongado (varias semanas o meses) (Wells, 1977; Wells, 2007). En especies con reproducción prolongada, las hembras llegan asincrónicamente al sitio reproductivo y existe una selección positiva hacia determinado tipo de machos. En especies con reproducción explosiva los machos vocalizan en coros que probablemente anuncian la posición de los sitios reproductivos a las hembras que arriban de manera sincrónica a los mismos (Wells, 1977). Las agregaciones de reproductores explosivos son con frecuencia muy densas y los machos comúnmente superan a las hembras durante todo el período de reproducción (Wells, 1977; 2007). En consecuencia se espera que la competencia entre los machos para acceder a las hembras sea más importante que el potencial de elección por parte de las mismas (Wells, 1977; 2007; Cairo *et al.*, 2013). Este tipo de reproducción es característico de especies que se reproducen en charcos

temporales u otros hábitats efímeros (Wells, 1977) y ha sido bien estudiado en algunas familias de anuros como Bufonidae, Hylidae, Microhylidae y Ranidae (Izzo *et al.*, 2013). Diversos factores como la formación de charcos, cantidad de precipitación, competencia entre larvas, abundancia de depredadores en sitios reproductivos, edad de la primera reproducción y frecuencia de reproducción de cada hembra podrían haber conducido a la evolución de la estrategia reproductiva explosiva (Izzo *et al.*, 2013).

La inversión reproductiva (IR) es la proporción de recursos que invierte un organismo en la reproducción durante un período definido (Gadgil & Bossert, 1970). La distribución de los recursos para la actividad reproductiva en un año puede afectar a la cantidad de energía disponible para el crecimiento, supervivencia o reproducción futura (Quiroga & Sanabria, 2012), por lo tanto debe haber un equilibrio en la asignación de los recursos energéticos entre estas actividades (Castellano *et al.*, 2004). Una forma de medir el gasto de energía en la reproducción, es estimando la IR a través de proporciones como masa de la gónada relativa a la masa corporal o volumen de la puesta relativo al volumen corporal (Rodrigues *et al.*, 2005). En hembras de anuros que no presentan cuidado parental, los recursos son invertidos en la producción de oocitos (Camargo *et al.*, 2008; Pupin *et al.*, 2010). Estos recursos son directamente afectados por la condición de las hembras, particularmente por la cantidad de energía almacenada en cuerpos grasos (CG) (Castellano *et al.*, 2004). Trabajos previos con *Pleurodema thaul*, una especie con ciclo reproductivo casi continuo (Díaz-Paéz & Ortiz, 2001) y con *Physalaemus riograndensis*, una especie con reproducción prolongada (Pereira & Maneyro, 2012), han reportado una relación inversa entre el tamaño de los CG y el desarrollo gonadal, sugiriendo que estas estructuras son la fuente de energía usada para la reproducción.

Por otra parte, en hembras a menudo existe un *trade-off* entre el número y tamaño de los oocitos (TO) (cantidad vs calidad) (Pupin *et al.*, 2010). Diversos estudios han encontrado que, independientemente del patrón reproductivo, en hembras existe generalmente una correlación positiva entre el número de oocitos y la longitud hocico-cloaca (LHC) (Rodrigues *et al.*, 2003; 2004, Camargo *et al.*, 2005, 2008; Maneyro *et al.*, 2008; Pereira & Maneyro, 2012, entre otros); por ello, hembras adultas de mayor tamaño tendrían mayor potencial reproductivo (Prado & Haddad, 2005). La relación entre TO y

tamaño corporal no es tan clara, ya que hay una correlación negativa entre el TO y tamaño de la puesta y una gran variación individual en el TO (Castellano *et al.*, 2004). La correlación positiva entre el tamaño de la puesta y el corporal, es uno de los factores propuestos para entender el dimorfismo sexual en el tamaño a favor de las hembras, que ocurre en el 90% de las especies de anuros (Shine, 1979). La selección sexual es otra de las principales causas sugeridas para explicar el dimorfismo sexual (Woolbright, 1983); no obstante aspectos demográficos como por ejemplo diferencias en la estructura de edades entre los sexos en la población reproductiva, pueden ser muy importantes (Monnet & Cherry, 2002; Gramapurohit *et al.*, 2004; Vargas-Salinas, 2006).

El género *Melanophryniscus* Gallardo 1961, está compuesto en la actualidad por 26 especies (Frost, 2014). La mayoría de estas especies presentan reproducción explosiva, asociadas a altos niveles de precipitación, que permiten la formación de los cuerpos de agua temporales utilizados para el evento reproductivo (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Cairo *et al.*, 2008, 2013; Maneyro & Kwet, 2008; Vaira, 2005, entre otros). *Melanophryniscus montevidensis* (Philippi, 1902), es una especie de distribución casi restringida a la costa de Uruguay, ya que fuera de este país se conocen unos pocos registros en el sur de Brasil (Bernardo *et al.*, 2012). Presenta una estrategia reproductiva de tipo explosiva, verificándose eventos a lo largo de todo el año asociados a fuertes lluvias (Maneyro & Carreira, 2012). La reproducción se produce en charcos semipermanentes o pequeños cursos de agua, entre las dunas (Alonzo *et al.*, 2002). *M. montevidensis* se encuentra amenazada a nivel local y global debido a su drástica disminución poblacional, a causa de la destrucción y degradación del hábitat, su acotada extensión de ocurrencia y la creciente urbanización de las zonas costeras, entre otras causas (Langone, 2004).

El objetivo general de este capítulo es describir el patrón reproductivo de una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* en la Barra de la Laguna de Rocha (BLR). Los objetivos específicos son: 1) Determinar la correlación entre la actividad reproductiva y algunas variables climáticas (temperatura, precipitación y humedad); 2) Estudiar la variación mensual en longitud hocico-cloaca (LHC) (mm) en la población; 3) Determinar la proporción de sexos en los cuerpos de agua reproductivos; 4) Verificar la

existencia de un dimorfismo sexual en los individuos encontrados en reproducción; 5) Analizar la relación entre la fecundidad (F) y el tamaño de los huevos (TH) con LHC (mm) en hembras; 7) Determinar la Inversión Reproductiva (IR) en hembras; 7) Estudiar la variación mensual en IR, F y TH en hembras reproductivas.

Se pondrán a prueba las siguientes hipótesis:

1. Las precipitaciones favorecen la actividad reproductiva en *Melanophryniscus montevidensis*.

Predicción: se observarán eventos de actividad reproductiva en los días con mayor precipitación acumulada.

2. Existe un marcado dimorfismo sexual en la especie con una razón de sexos sesgada a favor de los machos.

Predicciones:

a. Mayor cantidad de machos que de hembras en los sitios reproductivos.

b. Hembras más grandes que machos.

3. La dinámica reproductiva explosiva implica que las hembras de *M. montevidensis* estén preparadas para el evento reproductivo en cualquier momento del año, comprometiendo la inversión en crecimiento para maximizar la IR futura.

Predicciones:

a. No se encontrará una correlación positiva y significativa entre F/LHC, ni entre TH/LHC en hembras en actividad reproductiva.

b. La IR no presentará variación significativa entre los meses de actividad reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se desarrolló en la Barra de la Laguna de Rocha (BLR) (34° 40' 02" Sur; 54° 14' 00" Oeste), Departamento de Rocha, Uruguay (Fig. 1.1). Esta zona forma parte del Paisaje Protegido Laguna de Rocha del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (DINAMA, 2010). El área posee sistemas dunares costeros y praderas inundables

asociadas, donde se forman los cuerpos de agua temporales utilizados por *M. montevidensis* durante los eventos reproductivos.

Trabajo de campo y toma de datos

Se realizaron salidas mensuales de tres días de duración cada una durante el período marzo de 2012 a febrero de 2013. Fueron seleccionados cinco sitios en la BLR para el monitoreo. Estos sitios que incluyen el charco y zonas aledañas fueron identificados como C1, C2c, C2t, C3 y C4 (Fig. 1.2a; Fig. 1a y 1b; apéndice 1). Los datos de temperatura media (°C), precipitación total acumulada (mm) (Fig. 1.3) y humedad relativa media (%) en la zona durante el período de muestreo fueron obtenidos a partir de la estación meteorológica n°865650 de Rocha, ubicada a 20 km del área de estudio (datos disponibles en <http://www.tutiempo.net/clima/ROCHA/865650.htm>).

Se eligieron dos de los cinco sitios para trabajar durante los eventos reproductivos: el C1 (34°39' 48,6" S) (54°13' 14,3" W) y C2t (34°39' 49,7"S) (54°13' 33,4"W) (Fig. 1.2b), los cuales distan 215,78 m entre sí, y presentan un área de 338,83 m² y de 797 m², respectivamente. Dicha elección, respondió principalmente a los mayores niveles de actividad de la especie observados en estos sitios durante el evento reproductivo. El muestreo en C1 y C2t se realizó durante el día de manera estandarizada (los charcos se recorrieron desde los bordes hacia el centro, durante al menos 3 horas) y se tomaron las temperaturas de agua, aire, y pH del agua. Todos los individuos encontrados en actividad reproductiva fueron capturados, sexados y se colocaron en frascos etiquetados individualmente, conteniendo agua del lugar. Las parejas en amplexo también fueron capturadas y se depositaron en recipientes plásticos con agua y un poco de vegetación del charco hasta verificar que se producía el desove. Todos los individuos fueron medidos (longitud hocico-cloaca = LHC) con un calibre digital Kamasa de 0,01 mm de precisión, y se determinó su masa utilizando un dinamómetro (Pesola®) de 0.01 g de precisión. Se registraron las marcas naturales (patrón ventral de coloración) de cada sapo a través de fotografías (Elgue *et al.*, 2013) utilizando 2 cámaras NIKON (modelos: L810 y P500; resolución: 16.0 y 12.1 MP, respectivamente) para individualizar a los ejemplares mediante técnica de fotoidentificación. También se tomaron fotografías de las puestas

(con una escala de referencia de 10 mm) para determinar el tamaño de los huevos. Una vez finalizada la toma de datos, las puestas y todos los individuos capturados fueron devueltos al sitio de captura. Adicionalmente, en el mes de agosto, fueron sacrificadas cuatro hembras luego del desove con el fin de diseccionarlas y ver si conservaban oocitos maduros y si poseían cuerpos grasos. También se trabajó en el laboratorio con tres machos vocalizadores que murieron en el campo (2 de octubre y 1 de diciembre) para evaluar si presentaban o no reservas lipídicas.

Durante cada evento reproductivo, a lo largo de dos días y tres turnos de monitoreo (mañana (08:00-13:00 hs), tarde (14:00-19:00 hs) y noche (20:00-24:00 hs)); se realizaron muestreos auditivos de 15 minutos de duración en los cinco sitios. El objetivo fue determinar el patrón de actividad de vocalización a escala diaria (turno de actividad) de los machos de *M. montevidensis*. Por otra parte, en los meses sin actividad reproductiva, se realizó una búsqueda activa de individuos en los cinco sitios (ver metodología capítulo 3). Cabe destacar que en los meses de reproducción, también fueron buscados activamente individuos en toda el área de estudio. Estos animales también fueron medidos, pesados, y liberados luego en el mismo sitio de captura. Se tomó como referencia al macho de menor LHC con saco vocal desarrollado y a la hembra más pequeña encontrada en actividad reproductiva, para diferenciar entre adultos y juveniles. Individuos con medidas inferiores fueron considerados juveniles.

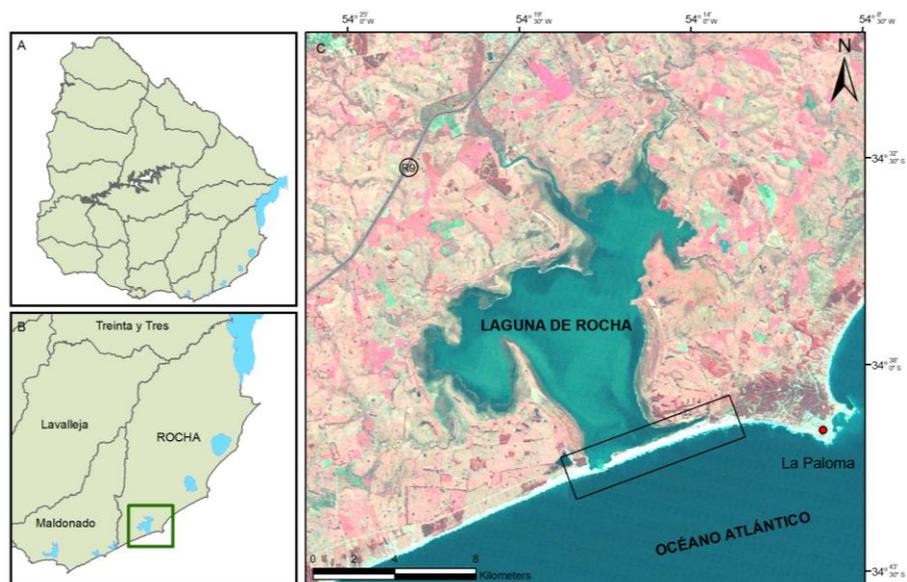


FIGURA 1.1. Laguna de Rocha. El rectángulo negro está indicando la zona de la Barra de la Laguna de Rocha.



FIGURA 1.2. Imagen Satelital de la BLR tomada y modificada de Google Earth 2013. **a.** Los puntos verdes indican los 5 sitios de muestreo seleccionados. **b.** Las marcas rojas indican el área donde se encuentran los charcos seleccionados en C1 y C2t para los estudios de biología reproductiva de *M. montevidensis*.

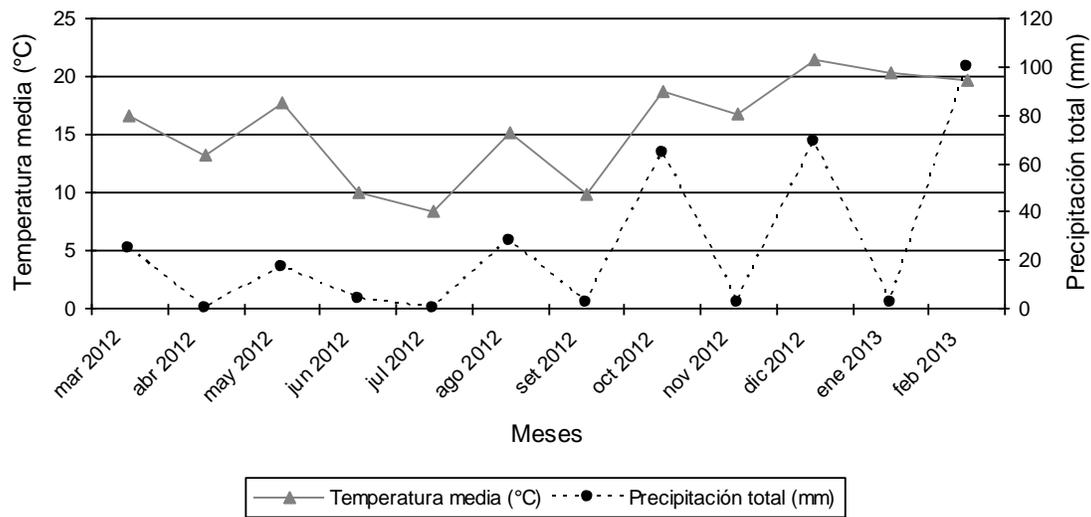


FIGURA 1.3. Temperatura media mensual y precipitaciones acumuladas en el área de estudio. NOTA: Los datos climáticos están acotados a los días de monitoreo más los 2 días previos a la toma de datos.

Procesamiento y análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa PAST (PAleontological STatistics), versión 1.94b y Statistica versión 6.1. En todos los casos, para probar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos, se utilizaron las pruebas de Levene y de Shapiro-Wilk (SW), respectivamente. El nivel de significación se estableció a $\alpha=0,05$.

La actividad reproductiva se clasificó categóricamente en 0 (ausencia) y 1 (presencia). Para evaluar la posible existencia de una correlación entre esta variable de respuesta binaria y las variables independientes temperatura media ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa media (%) y precipitaciones acumuladas (mm) se efectuaron regresiones logísticas. Se consideraron las variables climáticas acotadas a los días de muestreo, incluyendo también los dos días previos. También se estudió mediante regresiones logísticas la correlación entre la actividad reproductiva y los parámetros medidos en campo (temperatura del agua y pH del agua en cada uno de los dos charcos de monitoreo). Se determinó la frecuencia relativa de machos y hembras en cada uno de los charcos durante los eventos de reproducción y se calculó la razón de sexos (número de machos/número de hembras) para comprobar la posible existencia de diferencias en la proporción de sexos en estos sitios. Por otra parte, para analizar la variación a lo largo del año en LHC de toda la población se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Con el propósito de verificar si los mismos individuos participaron en distintos eventos reproductivos a lo largo del año de estudio, se analizaron las fotografías de machos y hembras en actividad reproductiva. Se generó un banco de datos compuesto por imágenes de todos los eventos de captura anteriores. La comparación de las fotos y la identificación individual a partir de las marcas naturales se realizó utilizando el método de fotoidentificación (FI) asistida por software (Caorsi *et al.*, 2012; Cairo *et al.*, 2013; Elgue *et al.*, 2013) con el programa WILD ID 1.0 (Bolger *et al.*, 2011).

A partir de las fotografías de las puestas de las hembras que lograron desovar, en el laboratorio, se determinó la fecundidad (F) (n° de huevos) y el tamaño de los huevos (TH). Para ello, de cada foto, fueron seleccionados 10 huevos al azar, se midió su diámetro utilizando el software Micrometrics® SE Premium (www.accu-scope.com) y luego se halló

el promedio entre esas medidas. Se calculó la Inversión Reproductiva (IR) de las hembras [F/LHC (mm)] y se verificó su variación mensual utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, para determinar la posible existencia de una correlación positiva entre F/LHC y entre TH/LHC, fueron realizados análisis de regresión lineal entre estas variables. Para corroborar si existían diferencias en la F y en el TH entre los meses se aplicó nuevamente el test de Kruskal-Wallis debido a que no se cumplían los supuestos para la aplicación de un test paramétrico. Finalmente, para confirmar si *M. montevidensis* presenta dimorfismo sexual, se comparó la longitud-hocico-cloaca (LHC) y la masa corporal entre machos y hembras encontrados en actividad reproductiva mediante la utilización del test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Por otra parte, los seis individuos colectados, fueron disecados en el laboratorio. En las hembras, los ovarios fueron extraídos para evaluar el grado de desarrollo gonadal. Los oocitos se clasificaron en inmaduros I, inmaduros II, atrésicos y maduros (de mayor tamaño, color marrón oscuro) (Pereira & Maneyro, 2012). La F se registró para cada ovario (Camargo *et al.*, 2005). En ambos sexos, el tamaño relativo de los cuerpos grasos fue cuantificado en forma categórica (ausentes, pequeños, intermedios y grandes) para analizar las posibles asociaciones entre su tamaño y la actividad reproductiva. Estos fueron considerados “grandes” cuando ocupaban una considerable porción de la cavidad abdominal cubriendo casi por completo a las gónadas; “intermedios” cuando cubrían solamente la parte frontal de las gónadas y “pequeños” cuando el tamaño era menor (Pereira & Maneyro, 2012).

RESULTADOS

Patrones de actividad

A lo largo de los 12 meses de trabajo fueron encontrados 1627 individuos de *M. montevidensis* en el área de estudio. Los valores medios de LHC y M fueron $22,18 \pm 2,42$ mm y $1,14 \pm 0,32$ g, respectivamente. El individuo más pequeño encontrado midió 8,31 mm y fue un juvenil capturado en agosto, mientras que el más grande con 28,97 mm corresponde a una hembra encontrada en agosto en actividad reproductiva. Por otra parte, los animales menos pesados fueron siete juveniles capturados también en agosto

todos con 0,05 g y el individuo que presentó mayor masa fue una hembra hallada en octubre también en reproducción con 3,0 g. Se encontró una variación mensual significativa en LHC de toda la población (n=1627) a lo largo del año (H=98,74; p<0,05).

A partir de la presencia de machos vocalizando y de parejas en amplexo, fueron identificados cuatro eventos de actividad reproductiva para *M. montevidensis* en la BLR durante el año de estudio. Los mismos ocurrieron en los meses de agosto, octubre y diciembre de 2012 y en febrero de 2013. En agosto y octubre se encontró actividad en los dos cuerpos de agua seleccionados en C1 y C2t; pero en diciembre y febrero no se registró actividad reproductiva en C1. Esto probablemente ocurrió a causa de que en ese charco hubo un aumento muy pronunciado de la vegetación y disminuyeron notablemente los niveles de agua. Los machos de la especie presentaron actividad de vocalización a lo largo de los tres turnos de monitoreo (mañana, tarde y noche) (Tabla 1, apéndice 1).

Por otra parte, se encontró una correlación positiva y significativa entre la actividad reproductiva (AR) y la precipitación total acumulada (mm) ($\chi^2 (1)=13,71$; p<0,05); mientras que la correlación con la temperatura media (°C), fue marginalmente significativa ($\chi^2 (1)=4,03$; p=0,045). No se halló correlación entre la AR y la humedad relativa media ($\chi^2 (1)=2,11$; p=0,14). Los cuatro eventos de actividad reproductiva coinciden con los cuatro picos de precipitaciones acumuladas a lo largo del año de estudio y se producen a valores por encima de los 60 mm (con excepción de agosto donde la precipitación acumulada fue de 27,94 mm). Considerando las variables medidas en campo, temperatura y pH del agua, no se encontró una correlación entre estos parámetros y la actividad reproductiva en C1 y C2t (Tabla 1.1).

TABLA 1.1. Resultados de las regresiones logísticas entre la variable de respuesta binaria actividad reproductiva (AR) (0=ausencia; 1=presencia) y las variables temperatura media del agua (TMA=°C) y pH del agua en C1 y C2t.

Variables	χ^2 (grados de libertad)	p
C1: pH-AR	0,65 (1)	0,42
C1: TMA (°C)-AR	0,59 (1)	0,80
C2t: pH-AR	0,35 (1)	0,85
C2t: TMA (°C)-AR	2,15 (1)	0,14

Proporción de sexos y dimorfismo sexual

Se encontraron en total 413 individuos de *M. montevidensis* en actividad reproductiva en los dos cuerpos de agua monitoreados; el 13,8% perteneció a C1, mientras que el restante 86,2% a C2t (Fig. 1.4). De ese total (n=413), el 81,8% fueron machos y el 18,2% hembras. El LHC medio para los machos fue de $21,54 \pm 1,24$ mm (rango entre 18,27-24,72 mm), mientras que la M media fue $1,04 \pm 0,14$ g (0,61-1,6 g). Para las hembras estos valores fueron de $24,18 \pm 1,33$ mm (21,82-28,97 mm) y $1,36 \pm 0,24$ g (0,8-2,1 g). Como se expresó anteriormente, el macho más pequeño con saco vocal desarrollado midió 18,26 mm, mientras que, la hembra más pequeña encontrada tanto en un charco durante un evento de actividad reproductiva, como en amplexo midieron 21,82 y 21,83 mm respectivamente. Todos los individuos que se encontraron por debajo de los mencionados valores de referencia para cada sexo fueron considerados juveniles (n=681). Cabe destacar que representantes de esta clase de edad se hallaron en todos los meses de estudio (Fig 1.5). La razón de sexos en los dos cuerpos de agua durante la actividad reproductiva estuvo sesgada a favor de los machos, siendo su frecuencia relativa mayor a la de las hembras en los 4 eventos reproductivos (Fig. 1.6; Tabla 2, apéndice 1). Finalmente, se encontró dimorfismo sexual significativo en *M. montevidensis*. Las hembras en actividad reproductiva presentaron mayor LHC ($U=1614,5$; $p<0,05$) (Fig. 1.7 y 1.8) que los machos reproductivos y también fueron más pesadas ($U=3304,5$; $p<0,05$).

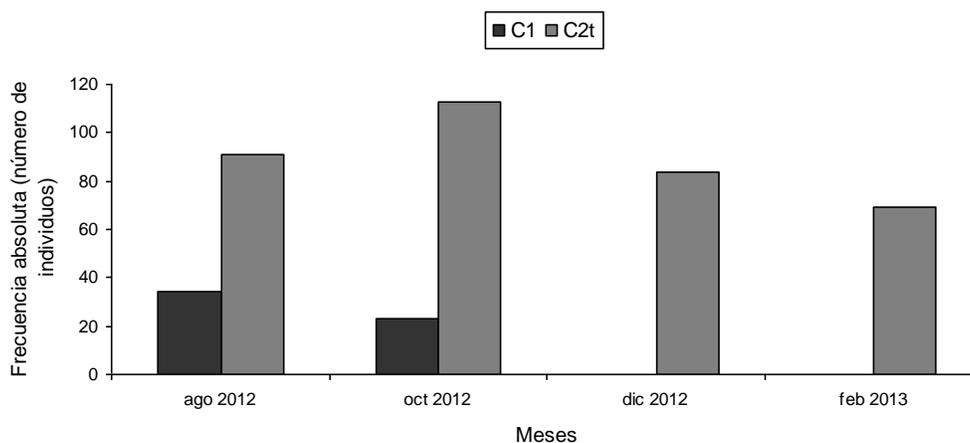


FIGURA 1.4. Variación mensual en la frecuencia absoluta de individuos de *M. montevidensis* encontrados en actividad reproductiva en los charcos C1 y C2t de la BLR.

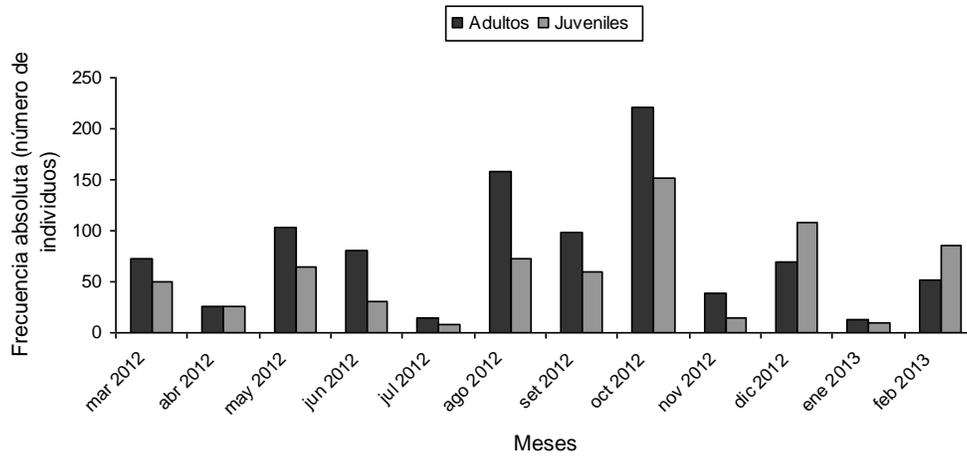


FIGURA 1.5. Variación mensual en la frecuencia absoluta de individuos adultos y juveniles de *M. montevideensis* a lo largo del año de estudio en la BLR.

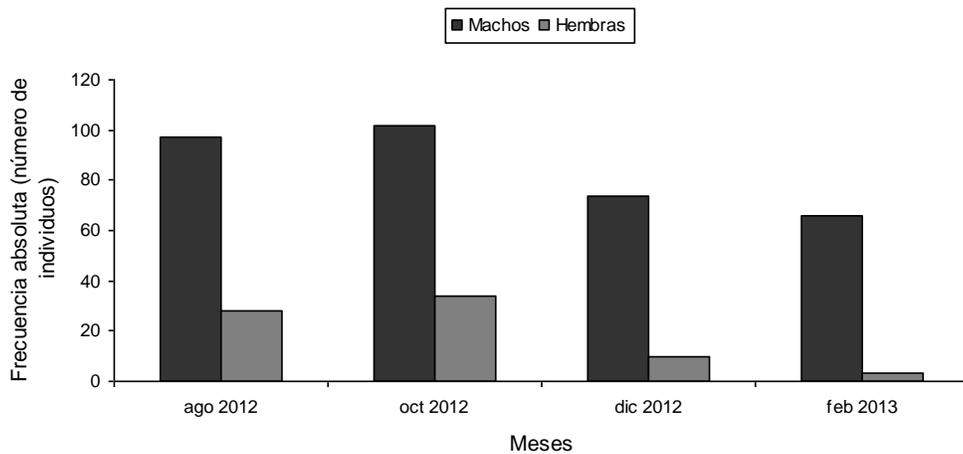


FIGURA 1.6. Variación mensual en la frecuencia absoluta de machos y hembras de *M. montevideensis* encontrados en actividad reproductiva en la BLR.



FIGURA 1.7. Amplexo encontrado en el mes de agosto en C2t. Nótese el mayor tamaño corporal de la hembra.

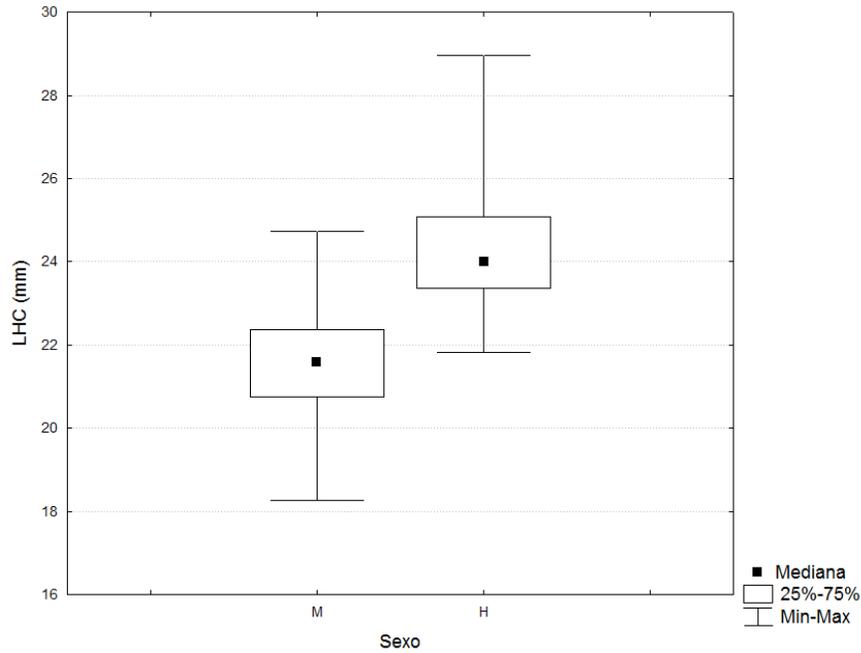


FIGURA 1.8. Variación en LHC (m) de machos y hembras de *M. montevidensis* en actividad reproductiva.

Fecundidad e inversión reproductiva en hembras

Fueron identificadas 59 parejas en amplexo (Fig. 1.7) (22 en el mes de agosto, 27 en octubre, 11 en diciembre y 2 en febrero). El 74,6% de las hembras encontradas en amplexo (n=59) logró desovar en cautiverio antes de que se produjera la separación (Fig. 2, apéndice 1), mientras que el restante 25,4% no lo pudo lograr. Todas las puestas consistieron en masas de huevos de número variable, separadas entre sí (Fig. 3, apéndice 1). La F media presentó un valor de 157 ± 101 huevos; el mínimo fue de 15 y el máximo de 347, ambos en hembras capturadas en octubre de 24,68 y 23,37 mm de LHC respectivamente. Por otra parte el tamaño medio de los huevos fue de $1,27 \pm 0,09$ (1,0-1,54) mm (Fig. 4, apéndice 1). No se encontró una correlación positiva entre $\log_{10} F$ y $\log_{10} LHC$ ($R^2=0,22$; $p=0,15$) (Fig. 1.9), ni entre $\log_{10} TH$ y $\log_{10} LHC$ ($R^2=0,019$; $p=0,78$). La IR media fue de $6,50 \pm 4,13$ (0,60-14,85) (Fig. 1.10). Finalmente no se encontró variación mensual significativa en IR ($H=5,93$; $p=0,12$), F ($H=5,19$; $p=0,15$) y TH ($F=6,29$; $P=0,09$) (Fig. 1.11, 1.12 y 1.13, respectivamente).

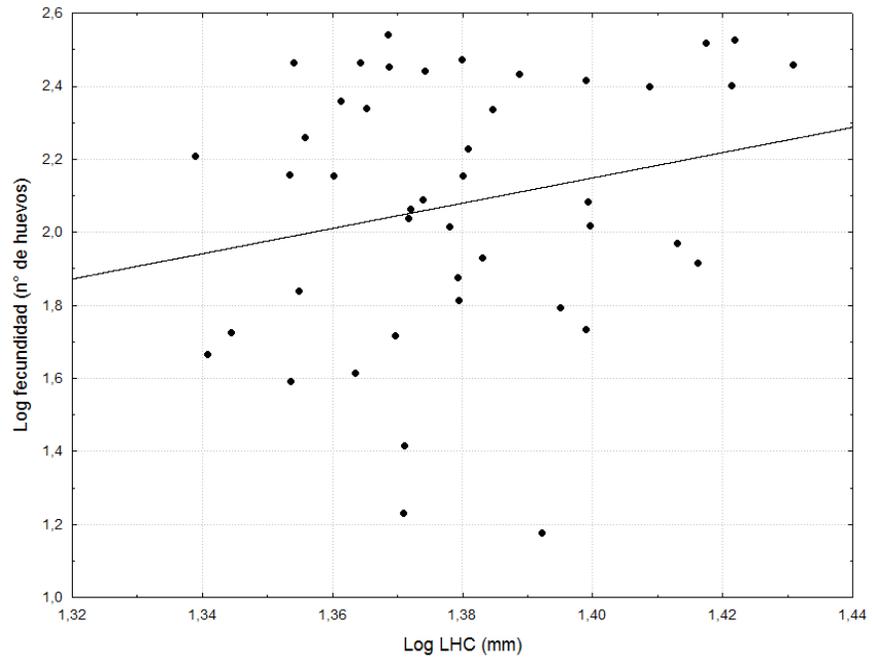


FIGURA 1.9. Modelo de regresión lineal entre \log_{10} LHC (mm) y \log_{10} F (n° de huevos) en hembras de *M. montevidensis*.

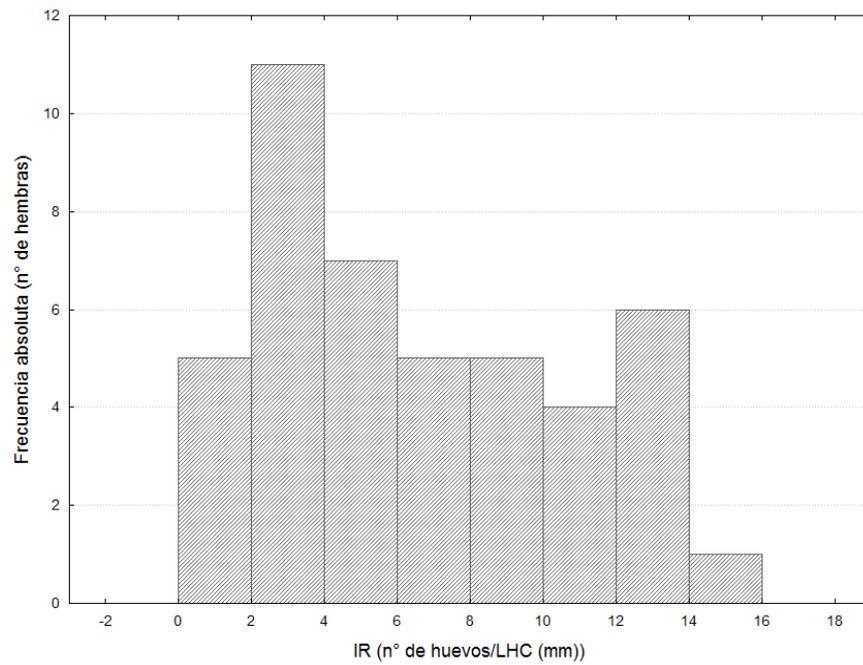


FIGURA 1.10. Distribución de frecuencias de la Inversión Reproductiva (IR) en hembras de *M. montevidensis*.

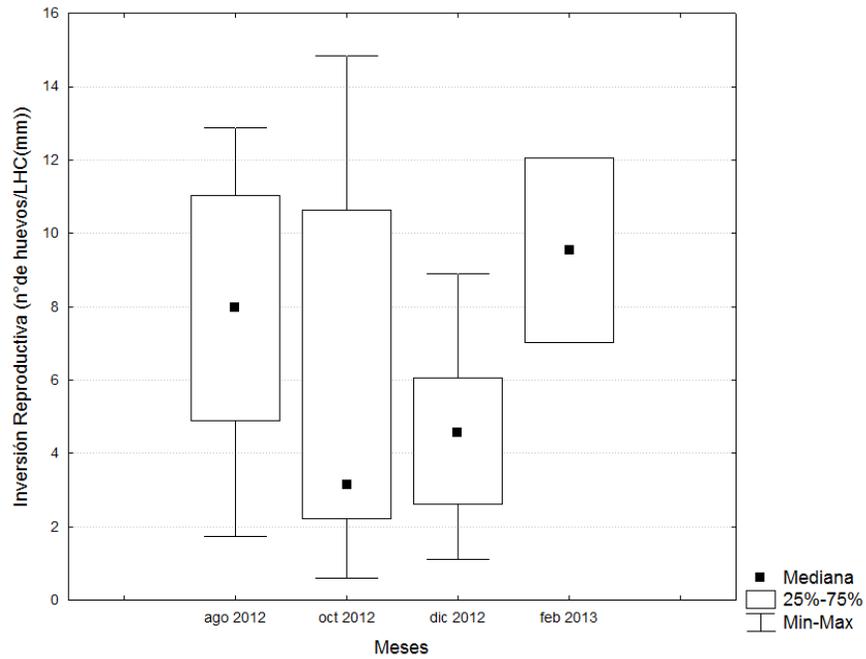


FIGURA 1.11. Variación mensual de la Inversión Reproductiva IR (n° de huevos/LHC mm) en hembras de *M. montevidensis*.

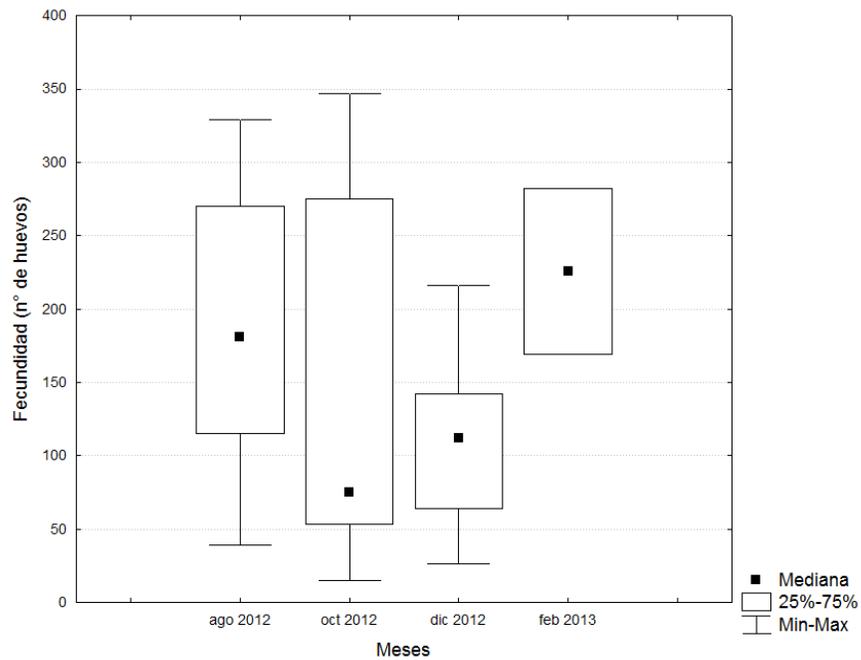


FIGURA 1.12. Variación mensual de la Fecundidad (n° de huevos) en hembras de *M. montevidensis*.

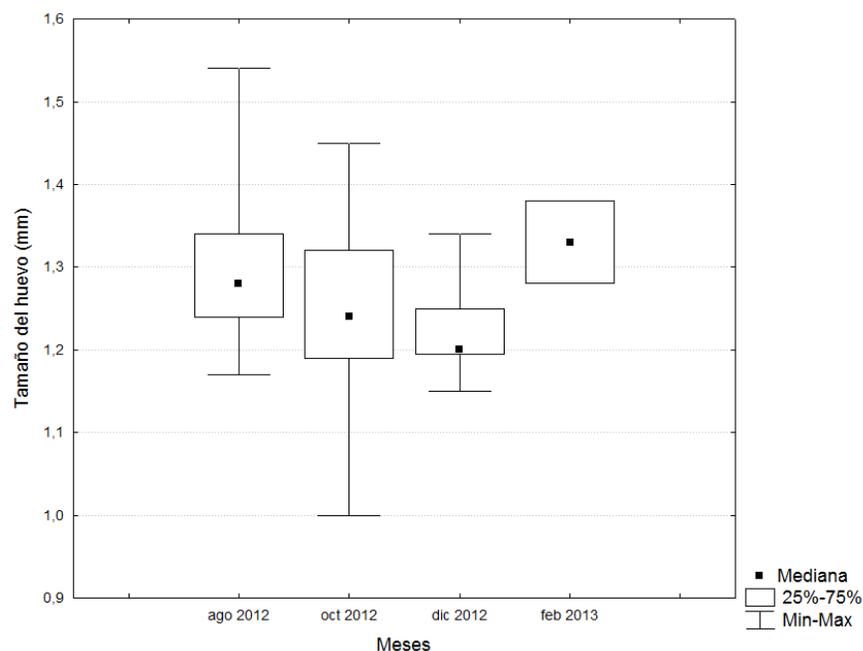


FIGURA 1.13. Variación mensual en el tamaño de los huevos en hembras de *M. montevidensis*.

Trabajo de laboratorio con animales colectados

Se constató que las cuatro hembras colectadas conservaban oocitos maduros luego del desove en el campo. La F media para esas hembras fue de $54,25 \pm 24,10$ oocitos (rango: 25-84). Cabe destacar que ambos ovarios además poseían oocitos inmaduros (en distintos estadios de desarrollo) y atrésicos. Adicionalmente se pudo comprobar que todos los individuos poseían reservas lipídicas. Tres hembras exhibieron escasos cuerpos grasos y una los presentó en la categoría de abundancia “medios”, mientras que todos los machos se caracterizaron por poseer abundantes reservas lipídicas.

FI de individuos en actividad reproductiva

La técnica de FI permitió identificar 43 recapturas (RC) entre todos los individuos en actividad reproductiva ($n = 413$). Sólo una hembra fue recapturada, el resto de las RC corresponden a machos. Cuatro animales se recapturaron dos veces, el tiempo mínimo entre la captura inicial y la última recaptura fue de cinco meses, mientras que el tiempo máximo fue de siete meses. El resto de los sapos fueron recapturados una sola vez. Sólo tres machos marcados en agosto fueron vueltos a encontrar en reproducción en octubre en C1. Un solo macho cambió de charco reproductivo (C1 en octubre a C2t en diciembre).

Todos los demás sapos fotoidentificados fueron capturados y recapturados en C2t (Fig. 1.14). La única hembra recapturada se observó en amplexo en C2t en el mes de agosto de 2012 (masa=1,25 g; LHC=22,58 mm) y se volvió a encontrar nuevamente en amplexo en el mismo charco en diciembre de 2012 (masa=1,05 g; LHC=22,92mm) (Fig. 1.15); en ambas instancias de reproducción logró desovar, poniendo 39 y 142 huevos, respectivamente. Por otra parte, únicamente cuatro machos fueron C y RC en amplexo en dos eventos reproductivos distintos en C2t; tres en agosto y octubre y uno en agosto y diciembre, respectivamente.

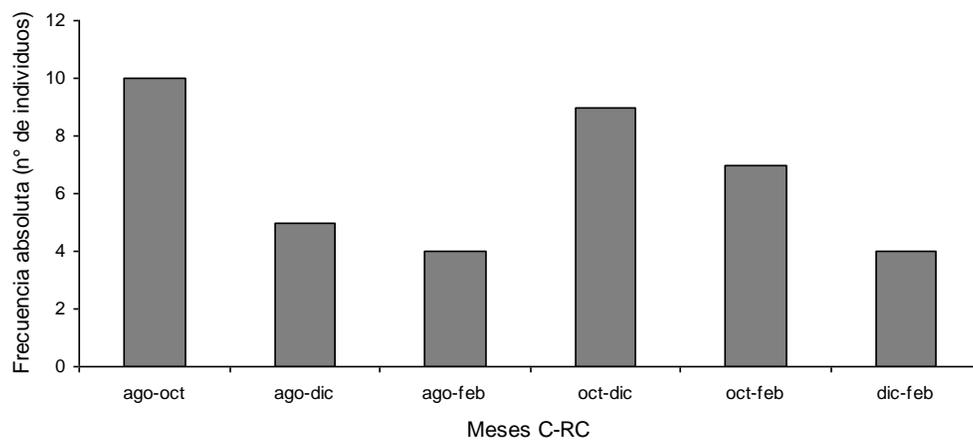


FIGURA 1.14. Variación mensual en el número absoluto de individuos de *M. montevicensis* capturados y recapturados (mes de captura-mes de recaptura), en C2t durante los distintos eventos de actividad reproductiva en la BLR.



FIGURA 1.15. Hembra de *M. montevicensis* recapturada en actividad reproductiva en C2t. Imagen izquierda: agosto 2012; imagen derecha: diciembre 2012.

DISCUSIÓN

Patrones de actividad

Melanophryniscus montevidensis presenta un patrón reproductivo explosivo, al igual que otras especies del género como *M. cambaraensis* (Santos & Grant, 2011); *M. devincenzii* (Maneyro & Kwet, 2008; Bortolini *et al.*, 2011); *M. stelzneri* (Bustos Singer & Gutierrez, 1997) y *M. rubriventris* (Vaira, 2005), así como las poblaciones argentinas de *M. montevidensis* (Cairo *et al.*, 2008, 2013). Los eventos reproductivos se registraron en invierno, primavera y verano; pero también se observó actividad en otoño en el mismo sitio (C. Bardier, com. pers.). A pesar de que la especie habita una zona templada estacional, los eventos reproductivos no son estacionales, sino que ocurren a intervalos variables a lo largo del año. Esto concuerda con lo reportado por Maneyro & Carreira (2012), pero contradice los reportes previos que limitaban la actividad de la especie entre la primavera y principios de otoño (Prigioni & Garrido, 1989; Achaval & Olmos, 2007). La falta de estacionalidad reproductiva ha sido reportada previamente por Santos & Grant (2011), para *M. cambaraensis*. En cambio, en *M. rubriventris* los eventos reproductivos mostraron ser estacionales (Vaira, 2005). Estos datos sugieren que la estacionalidad reproductiva puede variar dentro del género, a pesar de que las especies habiten zonas estacionales y presenten reproducción explosiva.

La actividad reproductiva de *M. montevidensis* se encontró correlacionada con la precipitación total acumulada. Esto es consistente con la dinámica explosiva, donde los eventos reproductivos están asociados a fuertes precipitaciones, siendo el volumen de las mismas el factor desencadenante de la actividad (Cairo *et al.*, 2008). Apoyando esta idea, los cuatro eventos reproductivos registrados para la especie coinciden con los períodos de máxima precipitación acumulada en el área de estudio, superando los 60 mm en octubre, diciembre y febrero. En otras especies del género con reproducción explosiva, el evento se disparó después de lluvias por encima de los 60 mm en *M. cambaraensis* (Caorsi, 2011); 35 mm en poblaciones de *M. montevidensis* de Argentina (Cairo *et al.*, 2008); entre 3-30 mm en *M. stelzneri* (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997) y 60 mm en *M. devincenzii* (Bortolini *et al.*, 2011). Por otra parte, factores como la humedad relativa media, la temperatura media y pH del agua (cerca de 7) no influyeron en la reproducción de la especie. En cambio, se

encontró una débil correlación con la temperatura media. Esto no es lo esperado para una especie de actividad reproductiva no estacional ya que la temperatura es una variable cíclica a escala anual. No obstante, hay que tener en cuenta que en regiones templadas este factor abiótico juega un rol fundamental en la actividad reproductiva de los anuros (Camargo *et al.*, 2005) y podría estar contribuyendo en cierta medida en la actividad reproductiva de *M. montevidensis* como un determinante a pequeñas escalas temporales.

Adicionalmente se encontró una variación mensual significativa en el tamaño corporal en la población de estudio. Esto comúnmente es un indicador de variación estacional en la actividad reproductiva de las especies (Pereira & Maneyro, 2012), por lo cual no es lo esperado en *M. montevidensis*. Sin embargo, en esta población los individuos juveniles estuvieron presentes en todos los meses de muestreo, lo que está correlacionado con una dinámica reproductiva no estacional. Esto estaría en concordancia con los resultados expuestos anteriormente, que indican que este bufónido puede reproducirse a lo largo de todo el año si las condiciones son apropiadas. El rápido desarrollo larvario que presenta esta especie (alrededor de 1 mes; Maneyro & Carreira, 2012) resulta también fundamental para poder comprender el patrón observado.

Los machos de *M. montevidensis* se escucharon vocalizando a lo largo de todo el día, incluso a altas horas de la noche (próximo a la medianoche) durante los distintos eventos reproductivos. También fueron observadas parejas en amplexo por la noche y animales moviéndose activamente fuera del período reproductivo. Este es un resultado muy relevante ya que la bibliografía ubica a *M. montevidensis* como una especie de actividad principalmente diurna (Maneyro & Carreira, 2012; Achaval & Olmos, 2007).

Proporción de sexos

En los charcos reproductivos fueron observadas densas agregaciones de individuos, y la abundancia de los machos superó a la de las hembras en todas las ocasiones, siendo la razón de sexos igual o mayor a 3. Wells (2007) argumenta que en agregaciones explosivas, los machos generalmente superan en número a las hembras durante todo el período reproductivo, por lo que la intensidad de la selección sexual es generalmente alta. Varios trabajos enfocados en especies con este patrón temporal de

reproducción encontraron resultados similares (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Alonzo *et al.*, 2002; Vaira, 2005; Cairo *et al.*, 2008, 2013). La proporción operativa de sexos junto al patrón temporal de reproducción son muy relevantes en los sistemas de apareamiento ya que influyen directamente en los tipos de comportamiento que van a utilizar los machos para conseguir amplexos (Woodward, 1984; Camargo *et al.*, 2005). En la población de estudio los machos tuvieron que alternar la actividad de vocalización con la búsqueda activa de hembras, y también se observaron luchas directas entre machos. Estos comportamientos fueron propuestos por Wells (1977) para agrupaciones de reproductores explosivos cuando la densidad de machos es alta; y han sido encontrados en muchas otras especies del género como *M. stelzneri*, *M. rubriventris*, *M. cambaraensis* y poblaciones argentinas de *M. montevidensis* (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Vaira, 2005; Caorsi, 2011; Cairo *et al.*, 2008).

En el mes de diciembre, se presencié el inicio de un evento de actividad reproductiva luego de una fuerte tormenta. Se constató que los machos llegaron antes que las hembras al cuerpo de agua. Bustos Singer & Gutiérrez (1997), informaron que en *M. stelzneri*, a los 40 minutos del comienzo de las lluvias los machos ya estaban vocalizando, mientras que las hembras demoraron entre 2 y 24 horas en aparecer. En otra población de *M. montevidensis* de Uruguay también se reportó que los machos fueron los primeros en llegar y que las hembras acudían aisladamente a los sitios de vocalización (Alonzo *et al.*, 2002). Según Semlitsch (2008), diferencias sexuales e interespecíficas en los tiempos de migración han evolucionado con el fin de maximizar el éxito reproductivo. La llegada temprana de los machos y un mayor tiempo de persistencia en el charco son mecanismos utilizados para aumentar el éxito de apareamiento (Vaira, 2005; Semlitsch, 2008). Por lo tanto, el arribo temprano de los machos de *M. montevidensis* podría ser una estrategia utilizada por los mismo para aumentar su *fitness*, en respuesta a la imprevisibilidad de las lluvias, la acotada extensión del período de actividad reproductiva y la proporción sesgada de sexos. Si bien en este trabajo no se evaluó el tiempo de persistencia de los machos en los charcos, sería muy interesante poder hacerlo ya que Vaira (2005) encontró para otra especie del género un aumento en el tiempo de permanencia de los machos en los charcos reproductivos de un año a otro. Quizás un

mayor tiempo de persistencia de machos de la especie en los cuerpos de agua en relación a las hembras podría en parte explicar el mayor número de machos observados en los sitios reproductivos en este estudio. Además de evaluar el tiempo de permanencia de los machos, también se debería monitorear el éxito de apareamiento como indicador de *fitness*.

Dimorfismo sexual

Las hembras reproductivas de *M. montevidensis* presentaron mayores tamaños corporales que los machos, patrón que se repite en la mayoría de las especies de anuros (Shine, 1979), particularmente en otros bufónidos del género, como *Melanophryniscus krauczuki* (Baldo & Basso, 2004); poblaciones argentinas de *M. montevidensis* (Cairo *et al.*, 2008) y *M. devincenzii* (Bortolini *et al.*, 2011). Las causas propuestas para explicar este fenómeno son variadas: 1) capacidad de hembras más grandes de producir puestas y oocitos de mayor tamaño (Camargo *et al.*, 2008); 2) diferencias en la edad de la primera reproducción (Rodrigues *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2011); 3) depredación diferencial de machos más grandes (Pupin *et al.*, 2010; Quiroga & Sanabria, 2012); 4) restricciones en el crecimiento de machos debido a demandas energéticas ligadas a los comportamientos precopulatorios durante la actividad reproductiva (Woolbrigh, 1989). En *M. montevidensis* el tamaño corporal de las hembras no se correlacionó con la fecundidad ni con el tamaño de los huevos, lo cual nos llevaría a pensar que este factor no sería responsable del dimorfismo sexual observado. La depredación diferencial hacia machos más grandes es una causa poco probable, ya que esto es más común en anuros con reproducción prolongada, donde el largo período reproductivo los vuelve más vulnerables (Camargo *et al.*, 2008). En cambio, para los depredadores es más difícil atacar coros explosivos, compuestos por muchos machos en un corto período de tiempo (Camargo *et al.*, 2008). Por otra parte, la reproducción explosiva puede favorecer la evolución de machos pequeños y más ágiles, esperándose lo contrario para los reproductores prolongados donde existe fuerte competencia a través de combates (Vargas-Salinas, 2006). Apoyando esta idea, el dimorfismo sexual inverso (machos más grandes que hembras) se ha observado con más frecuencia en especies muy territoriales o agresivas

(Wells, 2007; Di Cerbo & Biancardi, 2012). Los machos de *M. montevidensis* podrían aumentar su *fitness* si comienzan a reproducirse con pequeños tamaños y a participar de todos los eventos reproductivos posibles. Esto implicaría una alta inversión energética en la reproducción, limitando el crecimiento corporal. Por lo expuesto anteriormente, no se podría descartar este factor como causante del dimorfismo sexual en la especie, ni el hecho de que las hembras presenten madurez sexual tardía. No obstante, para poder determinar el efecto de estos factores en el dimorfismo sexual observado en *M. montevidensis* se necesitan realizar análisis complementarios a nivel demográfico, para poder determinar la edad de los individuos, utilizando por ejemplo técnicas de esqueleto-cronología.

Fecundidad e inversión reproductiva en hembras

El número y el tamaño de los huevos de *M. montevidensis* fue aproximado al encontrado en otras especies del género (también en cautiverio) como *M. stelzneri* (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997); *M. aff. montevidensis* (Cairo et al., 2008) y *M. cambaraensis* (Caorsi, 2011). Asimismo, estos valores fueron concordantes con los reportados previamente para *M. montevidensis* (Alonzo et al., 2002). La falta de correlación positiva entre F y TH con LHC, estaría indicando que el éxito reproductivo de las hembras no está relacionado con un mayor tamaño corporal. Por otra parte, se encontraron varias hembras con valores altos de IR (por encima de la media). Un patrón opuesto se registró en especies con reproducción prolongada, donde por lo general muy pocas hembras exhiben valores altos de IR (Pereira & Maneyro, 2012). Estos resultados estarían reflejando una asignación diferencial de los recursos energéticos entre hembras con distintos patrones temporales de reproducción. En reproductores prolongados a menudo el crecimiento se puede considerar una inversión en la reproducción futura ya que hembras más grandes presentan un mayor número o tamaño de huevos (Camargo et al., 2005; Pereira & Maneyro, 2012). Sin embargo, para las hembras con reproducción explosiva de *M. montevidensis*, que deben estar preparadas todo el año para la reproducción, sería más ventajoso invertir más cantidad de energía en cada evento reproductivo antes que priorizar el crecimiento para maximizar su futura IR. La falta de

variación mensual encontrada en los parámetros reproductivos (IR, F, TH) en este estudio estaría apoyando la idea anterior.

Trabajo de laboratorio con animales colectados

En el laboratorio se pudo constatar que las hembras conservaban oocitos maduros luego del desove; lo cual había sido reportado previamente para la especie por Prigioni & Garrido (1989). Además, estas hembras también presentaban oocitos inmaduros en distintos estadios de desarrollo y atrésicos. Este mismo patrón fue observado a lo largo de distintos meses del año en un trabajo previo con hembras de la especie, de colección (Pereira *et al.*, 2012). Las hembras de *M. montevidensis* conservarían siempre reservas de oocitos maduros para estar preparadas frente a un posible evento de actividad reproductiva que pueda surgir si las condiciones lo propician, confirmando que la inversión energética en la reproducción por parte de las hembras de la especie es muy alta. Por otra parte, la presencia de CG en machos y hembras reproductivos, estaría en consonancia con lo expuesto anteriormente ya que ambos sexos necesitan mantener todo el año una reserva lipídica que les sirva como fuente de energía para la actividad de vocalización y para la producción de oocitos. En este sentido, cabe destacar que todos los ejemplares diseccionados poseían contenido estomacal. Lo contrario ocurre en especies con reproducción prolongada donde por lo general existe una relación inversa entre el desarrollo gonadal y la abundancia de los cuerpos grasos y donde la mayoría de las hembras grávidas poseen los estómagos vacíos (Pereira & Maneyro, 2012).

Foto-identificación de individuos en actividad reproductiva

El alto porcentaje de machos recapturados en relación a las hembras probablemente sea una consecuencia de la alta densidad de los mismos en los charcos durante los eventos reproductivos. La única hembra recapturada logró desovar en ambas instancias, lo cual confirma lo expuesto en párrafos anteriores. Del total de machos recapturados solo uno cambió de sitio reproductivo, el resto se encontró siempre en el mismo charco a lo largo de los cuatro eventos reproductivos, incluso cuatro animales fueron recapturados dos veces en el mismo sitio. Esto estaría sugiriendo fidelidad al sitio

de reproducción. Este comportamiento ha sido demostrado para varias especies de anuros (Husté *et al.*, 2006) y puede haber evolucionado para aprovechar un charco con cierta estabilidad y propicio en un lugar conocido en vez de buscar un nuevo charco al alcanzar la madurez o durante los eventos reproductivos (Semlitsch, 2008). Esto también podría ser simplemente consecuencia de una dispersión limitada de los individuos (se refugian cerca del charco y vuelven al charco más cercano). Debido a las restricciones fisiológicas y ecológicas derivadas de la pérdida de agua; para los individuos de *M. montevidensis* puede ser ventajoso volver a los sitios conocidos y no incurrir en los altos costos de la dispersión hacia sitios alternativos (Seebacher & Ross, 1999; Semlitsch, 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados confirman que *Melanophryniscus montevidensis* presenta un patrón de reproducción explosivo, con eventos reproductivos ocurriendo a intervalos variables a lo largo del año. No se puede rechazar la hipótesis de que las precipitaciones favorecen la actividad reproductiva en la especie ya que la reproducción se encontró asociada con la precipitación total acumulada. La actividad de vocalización de los machos se extendió a altas horas de la noche, por lo cual se debe reconsiderar si la especie es exclusivamente diurna. La hipótesis que plantea la existencia de un marcado dimorfismo sexual en la especie con una razón de sexos sesgada a favor de los machos tampoco puede ser rechazada, ya que los machos superaron a las hembras en todos los eventos reproductivos y las hembras fueron más grandes y pesadas que los machos. Estos tuvieron que recurrir a estrategias comportamentales alternativas para obtener pareja como por ejemplo la búsqueda activa de hembras. Durante uno de los eventos se pudo constatar que los machos llegarían antes que las hembras al sitio de reproducción. La última hipótesis propuesta tampoco puede ser rechazada a causa de que no se encontró asociación entre LHC de la hembra con la F ni con el TH. Las hembras deben estar preparadas todo el año para reproducirse y sería más ventajoso invertir más energía en la reproducción antes que priorizar el crecimiento para maximizar la IR futura. La presencia de oocitos maduros y de reservas lipídicas luego del desove estarían confirmando esta idea. Finalmente existiría una cierta fidelidad al sitio reproductivo en la especie, ya que a lo largo de los distintos

eventos reproductivos, individuos fueron recapturados en actividad en el mismo charco. La falta de información acerca de la historia natural de la mayoría de las especies de anfibios es uno de las principales dificultades para proponer estrategias de conservación. Los datos obtenidos en este estudio acerca de la biología reproductiva de *M. montevidensis* pueden resultar de utilidad para proponer e implementar acciones en el marco del plan de manejo de la Barra de la Laguna de Rocha.

BIBLIOGRAFÍA

- Achaval, F. & Olmos, A. 2007. *Anfibios y reptiles del Uruguay*. 4ª edición. Graphis: Montevideo.
- Alonzo, A., Calixto, G. & Mato, J. 2002. Comportamiento sexual e interacciones intraespecíficas entre machos en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura-Bufonidae). En: Memorias del VI Congreso nacional y IV Congreso internacional de Profesores de Biología: Desafíos en la Enseñanza de la Biología, 156-163. Lavalleja, Uruguay.
- Ávila, R. W. & Ferreira, V. L. 2004. Riqueza e densidade de vocalizações de anuros (Amphibia) em uma área urbana de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 887-892.
- Baldo, D. & Basso, N. G. 2004. A new species of *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae), with comments on the species of the genus reported for Misiones, Northeastern Argentina. *Journal of Herpetology*, 38: 393–403.
- Bernardo-Silva, J., Martins-Ferreira, C., Maneyro, R. & Ochotorena de Freitas, T. R. 2012. Identification of Priority Areas for Conservation of Two Endangered Parapatric Species of Red-bellied Toads Using Ecological Niche Models and Hotspot Analysis. *Natureza & Conservação*, 10: 207-213.
- Bolger, D. T., Vance, B., Morrison, T. A. & Farid, H. 2011. Wild ID User Guide: Pattern Extraction and Matching Software for Computer-Assisted Photographic Mark-Recapture Analysis http://software.dartmouth.edu/Macintosh/Academic/Wild-ID_1.0.0.zip.

- Bortolini, S. V., Zanella, N., Maneyro, R., Pereira, G., Nunes, L., Souza Machado, L. & Severo Sielski, M. 2011. Reprodução de *Melanophryniscus devincenzii* (Anura: Bufonidae) no Parque Municipal de Sertão, Rio Grande do Sul. En: IX Congreso Latinoamericano de Herpetología.
- Both, C., Kaefer, I. L., Santos, T. G. & Cechin, S. T. Z. 2008. An Austral anuran assemblage in the Neotropics: Seasonal occurrence correlated with photoperiod. *Journal of Natural History*, 42: 205-222.
- Bustos Singer, R. & Gutiérrez, M. 1997. Reproducción y desarrollo larval del sapo enano: *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenbergh, 1875) (Anura: Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología*, 11: 21-30.
- Cairo, S. L., Zalba, S.M. & Úbeda, C. A. 2013. Reproductive pattern in the southernmost populations of South American redbelly toads. *Journal of Natural History*, 47: 2125-2134.
- Cairo, S. L., Maldonado, M. A., Zalba, S. M. & Úbeda, C. A. 2008. Conservación de *Melanophryniscus* sp. (sapito panza roja) en Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). En: *Ambientes y recursos naturales del Sudoeste Bonaerense: producción, contaminación y conservación (Actas de las V Jornadas Interdisciplinarias del Sudoeste Bonaerense)*, 445-455. Cazzaniga, N.J. & Arelovich, H.M (Eds.). EdiUNS: Bahía Blanca, Argentina.
- Camargo, A., Sarroca, M. & Maneyro, R. 2008. Reproductive effort and the egg number vs. size trade-off in *Physalaemus frogs* (Anura: Leiuperidae). *Acta Oecologica*, 34: 163-171.
- Camargo, A., Naya, D. E., Canavero, A., da Rosa, I. & Maneyro, R. 2005. Seasonal activity and the body size-fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. *Annales Zoologici Fennici*, 42: 513-521.
- Canavero, A., Arim, M., Naya, D.E. Camargo, A., da Rosa, I. & Maneyro, R. 2008. Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *North-Western Journal of Zoology*, 4: 29-41.

- Caorsi, V. Z. 2011. Comportamento reprodutivo de *Melanophryniscus cambaraensis* (Anura: Bufonidae) na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. Undergraduate Thesis. Universidade Federal de Rio Grande do Sul. 18 pp.
- Caorsi, V. Z., Santos, R. R. & Grant, T. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South American Journal of Herpetology*, 72:79-84.
- Castellano, S., Cucco, M. & Giacoma, C. 2004. Reproductive investment of female Green Toads (*Bufo viridis*). *Copeia*, 2004: 659-664.
- Díaz-Paéz, H. & Ortiz, J. C. 2001. The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. *Amphibia-Reptilia*, 22: 431-445.
- Di Cerbo, A. R. & Biancardi, C. M. 2012. Are there real sexual morphometric differences in yellow-bellied toads (*Bombina* spp.; Bombinatoridae)? *Amphibia-Reptilia*, 33: 171-183.
- DINAMA. 2010. *Plan de mediano plazo 2010/2014*. (Hemisferio Sur, Ed.) (1st ed., p. 118). Montevideo, Uruguay.
- Duellman, W. & Trueb, L. 1994. *Biology of the Amphibians*. The John Hopkins University Press.
- Elgue, E., Cruces, S., Pereira, G. Achaval-Coppes, F. & Maneyro, R. 2013. Validez de la fotoidentificación utilizando marcas naturales en *Melanophryniscus montevidensis*. En: Libro de Resúmenes XIV Congreso Argentino de Herpetología; p42.
- Frost, D. R. 2014. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0 (22 Jan. 2014). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gadgil, M. & Bossert, W.H. 1970. Life historical consequences of natural selection. *The American Naturalist*, 104: 1-24.

- Gramapurohit, N. P., Bhagyashri A. Shanbhag, B. A. & Srinivas K. Saidapur. 2004. Growth, Sexual Maturation and Body Size Dimorphism in the Indian Bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Daud.). *Herpetologica*, 60: 414-419.
- Guimarães, T. C. S., de Figueiredo, G. B., Mesquita, D. O. & Vasconcellos, M. M. 2011. Ecology of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a Neotropical Savanna. *Journal of Herpetology*, 45: 244-250.
- Husté, A., Clobert, J. & Miaud, C. 2006. The movements and breeding site fidelity of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in an urban park near Paris (France) with management recommendations. *Amphibia-Reptilia*, 27: 561-568.
- Izzo, T. J., Rodrigues, D. J., Menin, M., Lima, A. P. & Magnusson, W. E. 2013. Functional necrophilia: a profitable anuran reproductive strategy? *Journal of Natural History*, 46: 2961-2967.
- Jørgensen, C. B. 1992. Growth and reproduction. In *Environmental physiology of the Amphibians*, 437–466. Feder, M. E. & Burggren, W. W. (Eds.). Chicago: University of Chicago Press.
- Langone, J. 2004. *Melanophryniscus montevidensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. www.iucnredlist.org. Último acceso 16 de diciembre de 2013.
- Maneyro, R. & Carreira, S. 2012. Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la fuga, Montevideo.
- Maneyro, R. & Kwet, A. 2008. Amphibians in the border region between Uruguay and Brazil: Update species list with comments on taxonomy and natural history (Part I: Bufonidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*, 1: 95-121.
- Maneyro, R., Núñez, D., Borteiro, C., Tedros, M. & Kolenc, M. 2008. Advertisement call and female sexual cycle in Uruguayan populations of *Physalaemus henselii* (Anura, Leiuperidae). *Iheringia (Série Zoologia)*, 98: 210-214.
- Monnet, J. M. & Cherry, M. I. 2002. Sexual size dimorphism in anurans. *Proceedings of the Royal Society B*, 269: 2301-2307.

- Pereira, G. & Maneyro, R. 2012. Size-fecundity relationships and reproductive investment in females of *Physalaemus riograndensis* Milstead, 1960 (Anura, Leiuperidae) in Uruguay. *The Herpetological Journal*, 22: 145-150.
- Pereira, G., Fernández, C., Achaval-Coppes, F. & Maneyro, R. 2012. Biología reproductiva y dieta de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay. En: Libro de Resúmenes XIII Congreso Argentino de Herpetología; p138.
- Prado, C. P. A. & Haddad, C. F. B. 2005. Size-fecundity relationship and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, South-Western Brazil. *Herpetological Journal*, 15: 181-189.
- Prigioni, C. & Garrido, R. R. 1989. Algunas observaciones sobre la reproducción de *Melanophryniscus stelzneri montevidensis* (Anura, Bufonidae). *Boletín de la Sociedad zoológica del Uruguay (= Actas de las Jornadas de Zoología del Uruguay 2)*, 5; 13-14.
- Pupin, N. C., Gasparini, J. L., Bastos, R. P., Haddad, C. F. B. & Prado, C. P. A. 2010. Reproductive biology of an endemic *Physalaemus* of the Brazilian Atlantic forest, and the tradeoff between clutch and egg size in terrestrial breeders of the *P. signifer* group. *Herpetological Journal*, 20: 147-156.
- Quiroga, L. B. & Sanabria, E. A. 2012. Variation in reproductive parameters of *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura: Bufonidae) between the reproductive and post-reproductive periods. *Belgian Journal of Zoology*, 142: 68-73.
- Rodrigues, D. J., Lopes, F. S. & Uetanabaro, M. 2003. Padrão reprodutivo de *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia (Série Zoologia)*, 93: 365-371.
- Rodrigues, D. J., Uetanabaro, M. & Lopes, F. 2004. Reproductive strategies of *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) and *P. albonotatus* (Steindachner, 1864) at Serra da Bodoquena, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Española de Herpetología*, 18: 63-73.
- Rodrigues, D. J., Uetanabaro, M. & Lopes, F. S. 2005. Reproductive patterns of *Trachycephalus venulosus* (Laurenti, 1768) and *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) from the Cerrado, Central Brazil. *Journal of Natural History*, 39: 3217-3226.

- Saenz, D., Baum, K. A. & Conner, R. N. 2006. Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature, and season. *Herpetological Monographs*, 20: 64-82
- Santos, R. R. & Grant, T. 2011. Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evolutionary Ecology*, 25: 249-258.
- Seebacher, F. & Ross, A. A. 1999. Movement and Microhabitat Use of a Terrestrial Amphibian (*Bufo marinus*) on a Tropical Island: Seasonal Variation and Environmental Correlates. *Journal of Herpetology*, 33: 208-214.
- Semlitsch, R. D. 2008. Differentiating Migration and Dispersal Processes for Pond-Breeding Amphibians. *The Journal of Wildlife Management*, 72: 260-267.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*, 2: 297-306.
- Toledo, L. F., Zina, J. & Haddad, C. F. B. 2003. Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de anfíbios anuros do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. *Holos Environment*, 3: 136-149.
- Vaira, M. 2005. Annual variation of breeding patterns of the toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Vellard, 1947). *Amphibia-Reptilia*, 26:193-199.
- Vargas-Salinas, F. 2006. Sexual size dimorphism in the Cuban treefrog *Osteopilus septentrionalis*. *Amphibia-Reptilia*, 27: 419-426.
- Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25: 666-693.
- Wells, K. D. 2007. The ecology & behavior of amphibians. Chicago (IL): University of Chicago Press.
- Woodward, B. D. 1984. Arrival to and location of *Bufo woodhousei* in the breeding pond: effect on the operational sex ratio. *Oecologia*, 62: 240-244.
- Woolbright, L. L. 1983. Sexual selection and size dimorphism in anuran Amphibia. *The American Naturalist*, 121: 110-119.
- Woolbright, L. L. 1989. Sexual Dimorphism in *Eleutherodactylus coqui*: Selection Pressures and Growth Rates. *Herpetologica*, 45: 68-74.

APÉNDICE 1



FIGURA 1. Fotografías de las zonas de estudio. a) C1 ($34^{\circ}39' 48,6''$ S) ($54^{\circ}13' 14,3''$ W); b) C2t ($34^{\circ}39' 49,7''$ S) ($54^{\circ}13' 33,4''$ W).

TABLA 1. Turnos de actividad de machos vocalizadores de *M. montevidensis* en la BLR. **REFERENCIAS:** 1T: primer muestreo de tarde (14:00-19:00 hs); 1N: primer muestreo de noche (20:00-24:00 hs); 1M: primer muestreo de mañana (08:00-13:00 hs); 2T: segundo muestreo de la tarde; 2N: segundo muestreo de la noche; 2M: segundo muestreo de la mañana; C1, C2c, C2t, C3 y C4: sitios de muestreo; 0: ausencia de machos vocalizadores; 1: presencia de machos vocalizadores.

MUESTREO/TURNO	AGOSTO 2012					OCTUBRE 2012					DICIEMBRE 2012					FEBRERO 2013				
	SITIO DE MONITOREO																			
	C1	C2c	C2t	3	4	C1	C2c	C2t	3	4	C1	C2c	C2t	3	4	C1	C2c	C2t	3	4
1T	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
1N	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1M	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
2T	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
2N	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0

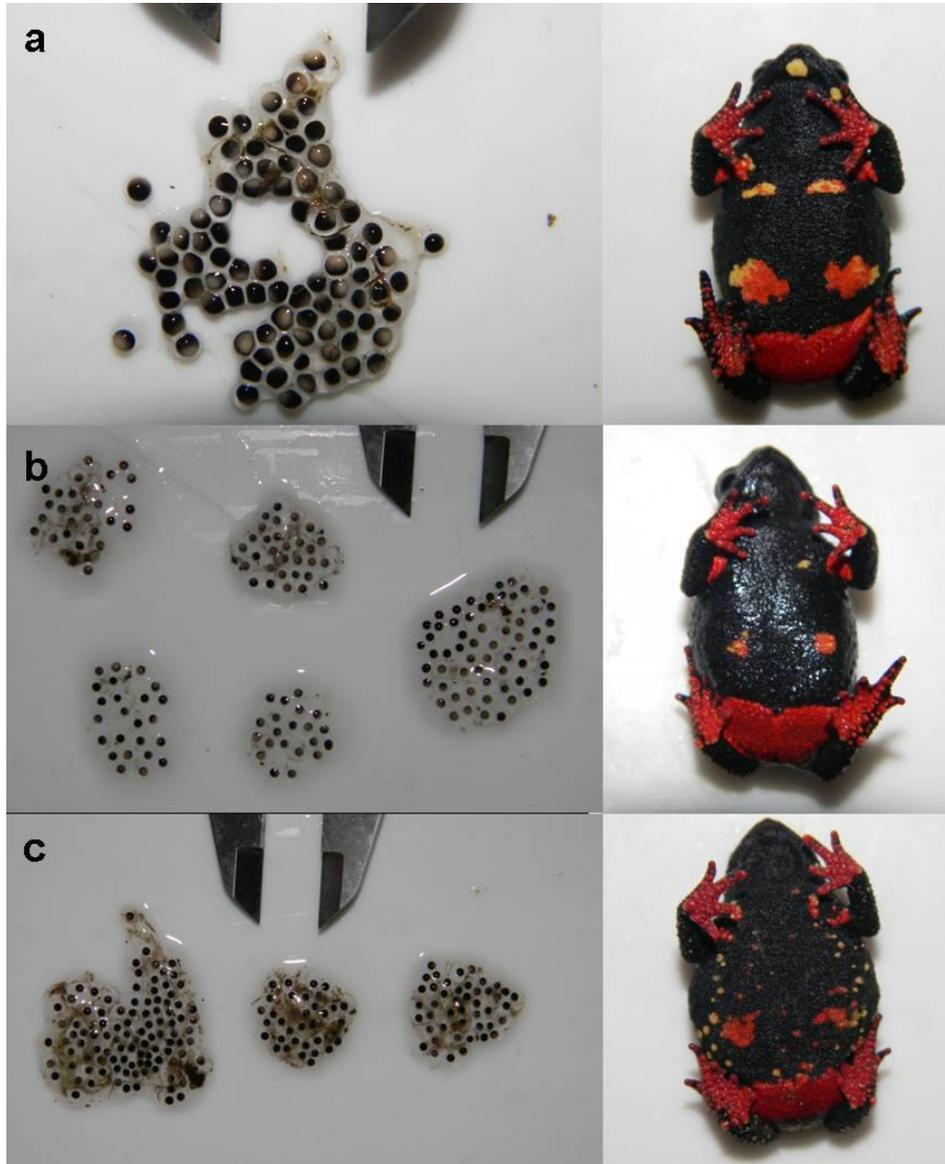
TABLA 2. Frecuencia relativa (FR) (%) y Razón de Sexos (n°machos/n°hembras) en *M. montevidensis* en los 2 charcos (C1 y C2t) monitoreados durante los eventos reproductivos.

Mes	FR ♂ C1	FR ♀ C1	RS C1	FR ♂ C2t	FR ♀ C2t	RS C2t
ago 12	88,24	11,76	7,5	73,63	26,37	2,79
oct 12	82,61	17,39	4,75	73,45	26,55	2,77
dic 12	---	---	---	88,09	11,90	7,40
feb 13	---	---	---	95,65	4,35	22,00



FIGURA 2. Amplexo en cautiverio capturado en el mes de agosto en C2t en el momento de desove.

FIGURA 3. Fotografías de 3 puestas de hembras de *M. montevidensis*, capturadas en amplexo el día 22/8/12. a) Charco=C1; LHC=24,16 mm; m=1,3 g; 1 masa de huevos; Fecundidad (F)=85 huevos. b) Charco=C2t, LHC=21,83 mm; m=1,0 g; 5 masas de huevos; F= 161 huevos. c) Charco=C2t; LHC=22,69 mm; m=1,2 g; 3 masas de huevos; F=181.



CAPÍTULO 2. “Uso del microhábitat reproductivo en una población de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay”

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se han reportado importantes disminuciones en las poblaciones de anfibios a nivel mundial, siendo la destrucción o modificación del hábitat, la principal causa propuesta para explicar este fenómeno (Collins & Crump, 2009; Stuart *et al.*, 2008). En consecuencia, trabajos relacionados con los determinantes en el uso del hábitat y la comprensión de por qué utilizan lugares específicos se vuelven relevantes para predecir cómo la pérdida o modificación del hábitat puede afectar la sobrevivencia de las poblaciones (Rittenhouse & Semlitsch, 2007; Johnson *et al.*, 2008). Los datos disponibles sobre los patrones del uso del hábitat en poblaciones de anfibios son escasos (Lemckert & Brassil, 2000; Krishnamurthy, 2003). Esta carencia de información dificulta el desarrollo de estrategias de conservación de especies a través de la protección o el manejo del hábitat.

El uso del espacio a nivel de microhábitats, se ve influenciado por varios factores como la historia evolutiva de las especies, las interacciones interespecíficas, y las presiones medioambientales (Eterovick *et al.*, 2010). Muchos aspectos vinculados con la ecología y la historia natural de los anfibios están determinados por relaciones que tienen lugar a escala de microhábitats (Eterovick *et al.*, 2010). Esto se debe principalmente a que los elementos del entorno proporcionan los requisitos esenciales en términos de alimentación, refugio y oportunidades para las interacciones sociales; determinando la presencia o prosperidad de una especie dentro de un área (Lemckert & Mahony, 2010).

El conocimiento del uso de determinados sitios reproductivos por los anuros es valioso para su gestión y conservación. Varios estudios han reportado que la presencia y abundancia de anuros en los lugares de reproducción depende fuertemente de un conjunto de características abióticas y bióticas (Lemckert & Mahony, 2010). Dentro del primer grupo se encuentran la profundidad, temperatura y calidad del agua, el hidroperíodo, el tamaño de los cuerpos de agua, la cantidad de vegetación emergente y el tipo/grado de cobertura vegetal en el suelo circundante. La cantidad de vegetación en los sitios reproductivos puede generar microhábitats complejos dentro de los charcos que podrían proporcionar refugios para las larvas y metamorfos frente a peces y otros posibles depredadores, así como alimento para las larvas (Lane *et al.*, 2007; Pereyra *et al.*, 2011). En este sentido, Kopp *et al.*, (2006) encontraron un aumento de la supervivencia de las

larvas en microhábitats con vegetación, lo que atribuyeron a una disminución en la eficacia de los depredadores en la búsqueda y captura de las larvas en estos microhábitats. Adicionalmente, en *Melanophryniscus stelzneri* la proporción de la vegetación que cubre la superficie del espejo de agua y la que rodea el charco se correlacionó positivamente con el uso del sitio reproductivo, lo que demuestra que estos animales prefieren los sitios de desove con densa vegetación en el interior del cuerpo de agua (Pereyra *et al.*, 2011). Finalmente, entre los principales factores bióticos influyentes se distinguen la presencia de depredadores y competidores (Lane *et al.*, 2007; Pereyra *et al.*, 2011).

La mayoría de los trabajos relacionados con el uso de los sitios reproductivos en anfibios están enfocados en ensamblajes de anuros a escala de hábitats. En ese contexto, donde la actividad se caracteriza por la agregación reproductiva de varias especies en los cuerpos de agua, el potencial de interacciones interespecíficas es muy alto (Bertoluci & Rodriguez, 2002; Vasconcelos & Rossa-Feres, 2008). En consecuencia, en estos sistemas, las interacciones bióticas como la depredación y competencia son mecanismos importantes en la estructuración de las comunidades de anuros (Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007; Daza-vaca & Castro-Herrera, 1999; Boelter, 2004). Los estudios de este tipo a nivel de poblaciones y microhábitats son muy escasos, sin embargo en estos casos es más viable reconocer el papel que pueden jugar factores abióticos (como las propias características del cuerpo de agua) en el uso del espacio por los anuros.

Melanophryniscus montevidensis (Philippi, 1902), se distribuye en la costa Atlántica de Uruguay y una pequeña parte de la costa sureste de Brasil (Toranza & Maneyro, 2013). Presenta una estrategia reproductiva explosiva, verificándose eventos a lo largo de todo el año asociados con fuertes precipitaciones, generalmente por encima de los 60 mm (Capítulo 1). Las especies con dinámicas reproductivas explosivas se caracterizan por poseer un período de actividad corto (horas o días) y en consecuencia conforman densas agregaciones en los charcos, resultando más importante la competencia entre los machos para acceder a las hembras que la elección de las mismas (Cairo *et al.*, 2013). Los machos son más abundantes en el sitio reproductivo durante todo el evento, por lo cual necesitan alternar la actividad de vocalización con tácticas alternativas como la búsqueda activa de

hembras grávidas y la estrategia de macho desplazador para aumentar su *fitness* (Wells, 1977; Pombal & Haddad, 2005). *Melanophryniscus montevidensis* es una especie en peligro a nivel local y global; dentro de las principales amenazas se encuentra la destrucción y degradación del hábitat (Langone, 2004). La información relacionada con las características y uso de su microhábitat reproductivo resulta esencial porque contribuye al desarrollo de estrategias de monitoreo más eficaces y a largo plazo de las poblaciones silvestres, al tiempo que facilita la implementación de acciones de conservación más efectivas.

El objetivo general de este capítulo es caracterizar el microhábitat reproductivo de *M. montevidensis* en la Barra de la Laguna de Rocha y describir el uso que realizan de este sitio los individuos de la especie durante los eventos de reproducción. Los objetivos específicos son: 1) Estudiar la asociación entre los individuos en actividad reproductiva y las características de los charcos; 2) Describir los principales comportamientos exhibidos por machos, hembras y parejas en amplexo durante los eventos de reproducción.

Se pondrá a prueba la siguiente hipótesis:

1. Los individuos en actividad reproductiva prefieren zonas del charco con mayor vegetación.

Predicción: la mayor proporción de individuos de *M. montevidensis* en actividad reproductiva se encontraran en zonas del charco con vegetación más densa.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Área de estudio

Este trabajo se desarrolló en la Barra de la Laguna de Rocha (BLR) (34° 40' 02" Sur; 54° 14' 00" Oeste). Esta zona forma parte del paisaje protegido Laguna de Rocha (LR) del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (DINAMA, 2010) y se encuentra sobre la costa Atlántica del Departamento de Rocha, Uruguay (34°35' S; 54°17' W) (Fig. 1.1 capítulo 1). La Laguna posee un área de 72 km² con una profundidad media de 0,6 m y una máxima de 1,4 m. Esta se comunica con el Océano Atlántico (hasta cinco veces al año) a través de la apertura y cierre de la barra arenosa (MVOTMA, 2014). En el entorno de la

BLR, la alta concentración de sales en el ambiente determina una cobertura vegetal psamófila. El área posee sistemas dunares costeros y praderas inundables asociadas, donde se forman los cuerpos de agua temporales de agua dulce utilizados por *M. montevidensis*.

Trabajo de campo y toma de datos

Se realizaron salidas mensuales de tres días de duración entre marzo de 2012 y febrero de 2013. El área de estudio comprende dos cuerpos de agua temporales donde se reproduce la especie, identificados como C1 (34°39' 48,6" S) (54°13' 14,3" W) y C2t (34°39' 49,7"S) (54°13' 33,4"W) (Fig. 1.1b, capítulo 1 y Fig. 1a y 1b, apéndice 1), los cuales se encuentran separados por 215,78 m. Los datos de temperatura media (°C), precipitación total acumulada (mm) (Fig. 1.2, capítulo 1) y humedad relativa media (%) en la zona durante el período de muestreo fueron obtenidos a partir de la estación meteorológica n ° 865650 de Rocha, que se encuentra ubicada a 20 km del área de estudio (datos disponibles en <http://www.tutempo.net/clima/ROCHA/865650.htm>).

Para la caracterización del microhábitat reproductivo, fueron registradas distintas variables relacionadas con los cuerpos de agua y con la vegetación del lugar. Tanto dentro del charco como en su entorno más próximo, se determinó la vegetación presente y dominante; los distintos estratos y el porcentaje de cobertura vegetal (%). Adicionalmente, para cada charco se registró el tipo de sustrato, el tamaño (m²) y la profundidad en cm (utilizando un metro plegable de plástico de 1 mm de precisión) (Pereyra *et al.*, 2011). Para conocer el tamaño del charco, se tomaron sus medidas de largo, ancho y las diagonales con una cinta métrica (10 mm de precisión). Luego se ubicó el sitio en Google Earth y se digitalizó en función de las medidas tomadas en campo. Finalmente, esos datos se ingresaron a un SIG a través del cual se calculó el área y perímetro de cada charco.

Se realizó un muestreo en cada charco por evento reproductivo, durante la mañana-tarde (entre las 11:00 y las 20:30 horas) y de manera estandarizada (los charcos se recorrieron desde los bordes hacia el centro, siguiendo un espiral, durante, al menos, tres horas). Al comienzo de cada muestreo fueron tomados datos de temperatura y pH del

agua y temperatura del aire. Todos los individuos encontrados en actividad reproductiva fueron capturados, sexados (machos se identificaron por la presencia de saco vocal desarrollado) y se colocaron en frascos etiquetados individualmente con una pequeña cantidad de agua del lugar. Las parejas en amplexo también fueron capturadas y se depositaron en recipientes plásticos con agua y un poco de vegetación del charco. En cada punto de captura se midió la profundidad (cm) y temperatura del agua (°C) y la distancia en metros al borde más cercano del charco. Simultáneamente fueron registrados los usos de la vegetación que realizan los machos, hembras y las parejas en amplexo y también los comportamientos exhibidos por los individuos en el momento de captura. Por otra parte, se tomaron las medidas en cm entre machos que se encontraban vocalizando muy cerca. Todos los individuos fueron medidos (longitud hocico-cloaca = LHC) con un calibre digital y se determinó su masa utilizando un dinamómetro (Pesola®) de 0,01 g de precisión. Finalmente se liberaron en el mismo sitio de captura.

Procesamiento y análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa PAST (PAleontological STatistics), versión 1.94 b y Statistica versión 6.1. En todos los casos para probar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos se utilizaron las pruebas de Levene y de Shapiro Wilk (SW), respectivamente. El nivel de significación se estableció a $\alpha=0,05$.

Para corroborar la asociación entre la distancia al borde del charco (DB) y la profundidad del agua se efectuaron análisis de regresión lineal entre estas variables. La variación a lo largo de los eventos reproductivos en la temperatura del agua (TA) se evaluó a través del test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Por otra parte, la actividad de vocalización de los machos se clasificó categóricamente en 0 (ausencia) y 1 (presencia) y para estudiar la asociación entre esta variable de respuesta binaria y la variable independiente DB se efectuó un análisis de regresión logística. Adicionalmente, para determinar si existen diferencias significativas en la DB entre machos vocalizadores (V) y no vocalizadores (NV) se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Finalmente, se calculó el índice de condición corporal (ICC) de los machos a partir de los residuos de la regresión entre el \log_{10} de la masa (g) y el \log_{10} de LHC (mm) (Reading, 2007). Se comparó el ICC entre machos vocalizadores y no vocalizadores a través del test no paramétrico U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

A partir de la presencia de machos vocalizando y de parejas en amplexo, fueron identificados cuatro eventos de reproducción para *M. montevidensis* en la BLR durante el año de estudio. Los mismos ocurrieron en los meses de agosto, octubre y diciembre de 2012 y en febrero de 2013. En C2t se encontró actividad reproductiva durante los cuatro eventos, mientras que en C1 solo se observó en agosto y octubre. Se encontraron en total 413 individuos en actividad reproductiva. De ese total, un 81,8% fueron machos y el restante 18,2% hembras. Adicionalmente, se identificaron 59 parejas en amplexo; 22 en el mes de agosto, 27 en octubre, 11 en diciembre y 2 en febrero.

Descripción del microhábitat reproductivo

Ambos charcos monitoreados corresponden a cuerpos de agua temporales poco profundos (por debajo de los 30 cm de profundidad) (Tabla 2.1) que tuvieron agua en la mayoría de los meses a lo largo del año de estudio. En este sentido, el charco C1 tuvo agua entre los meses de abril y octubre; en marzo se encontró totalmente seco, mientras que en los meses comprendidos entre noviembre y febrero de 2013 solamente se encontró el fondo húmedo. Por otra parte el charco C2t, también estuvo seco durante el mes de marzo, el resto de los meses presentó niveles considerables de agua, con excepción de noviembre y enero donde se vio el fondo húmedo y una disminución considerable en el volumen de agua, respectivamente. El área del charco C1 fue de aproximadamente 338,83 m² y su perímetro de 77,63 m; mientras que en C2t el área fue de 797 m² y el perímetro de 109,1 m. Los cambios en la temperatura media del agua (°C), profundidad media del agua (cm), pH del agua y sustrato del charco a lo largo de los distintos eventos de reproducción en el área de estudio se muestran en la tabla 2.1

En el sistema de estudio (incluye cuerpos de agua reproductivos y el entorno más próximo), la vegetación estuvo compuesta por herbazales hidrófilos, mesófilos y xerófilos (Fig. 2.1). En el herbazal hidrófilo las formaciones vegetales dominantes fueron: 1) caraguatal (compuesto por especies del género *Eryngium*); 2) juncal (compuesto por *Juncus macrocephalus* y *Schoenoplectus californicus* “Junco”); 3) pastizal hidrófilo (pastizal denso de hasta 50 cm de altura representado por *Ischaemum minus*, *Eleocharis sp.*, *Panicum gouinii*, *Leersia hexandra* y *Hydrocotyle sp.* (redondita de agua), entre otras); y 4) hunquillar (dominado por *Juncus acutus* de hasta 1 m de altura). En el herbazal mesófilo la formación vegetal principal fue el pastizal psamófilo representado por *Panicum sabulorum*, *Baccharis spicata*, *Androtrichum trigynum* y *Achyrocline satureioides*, *Pluchea sagittalis*, entre otras. Por último, en el herbazal xerófilo la formación vegetal dominante fue la estepa psamófila que es un pastizal abierto dominado por *Panicum racemosum* (pasto dibujante), *Margyricarpus pinnatus* e *Hydrocotyle sp.* También se registró la presencia de *Acacia longifolia* en la zona (Fig. 2.1).

La vegetación psamófila se dispone sobre lomas de arena cuya cobertura vegetal es de aproximadamente el 75 % y se distinguen dos estratos: el primero de hasta 15 cm de altura está dominado principalmente por *Panicum sabulorum*; en el segundo se encontraron mayoritariamente *Baccharis spicata* y *Androtrichum trigynum*, con una altura de entre 30-50 cm. Por otra parte, la vegetación hidrófila es la dominante en el sistema con una cobertura del suelo de aproximadamente el 80-90 %. La misma presenta dos estratos principales; el primero está conformado por pastizal hidrófilo de entre 25-50 cm de altura (Fig. 2.2), mientras que el segundo (de hasta un metro de altura) está constituido principalmente por *Schoenoplectus californicus*, *Juncus acutus* y caraguatales. Dentro de los cuerpos de agua el porcentaje de vegetación emergente varió entre las distintas estaciones siendo del 60% en otoño, entre 50-60% en primavera, menor al 20-30% en invierno y mayor o igual al 75% en verano.



FIGURA 2.1. Sistema de estudio, donde puede distinguirse claramente la vegetación psamófila e hidrófila, así como la presencia de *Acacia longifolia*.



FIGURA 2.2. Sitio reproductivo de *M. montevidensis* en la BLR. Se distingue la vegetación hidrófila, representada mayoritariamente por el pastizal hidrófilo de entre 25-50 cm de altura y también pueden observarse juncos.

TABLA 2.1. Datos de muestreo y variables descriptivas de los cuerpos de agua utilizados por *Melanophryniscus montevidensis* durante los eventos de actividad reproductiva en la BLR. **REFERENCIAS:** TMA: temperatura media del agua (°C); SD: desvío estándar; mín: valor mínimo; máx: valor máximo; PMA (cm): profundidad media del agua.

Día de muestreo	22/08/12	22/08/12	30/10/12	31/10/12	20/12/12	22/02/13
Charco	1	2t	2t	1	2t	2t
Hora inicio/fin	11:00/14:10	15:03/18:10	12:00/15:15	17:10/20:20	12:50/16:00	13:20/16:40
TMA ± SD (mín-máx)	24,38 ± 1,56 (21,2-27,4)	22,66 ± 1,12 (21,2-27,4)	20,42 ± 0,50 (19,2-21,7)	30,23 ± 1,78 (25,6-32,3)	27,35 ± 1,24 (24,3-29,4)	29,11 ± 2,25 (18,3-31,5)
pH agua	6,96	6,72	7,24	6,48	7,27	6,74
PMA ± SD (mín-máx)	4,22 ± 2,35 (1-10)	6,61 ± 2,03 (0,8-10,9)	6,81 ± 2,50 (1-13,5)	6,79 ± 3,63 (1,5-12,2)	15,54 ± 5,50 (2,2-23,8)	13,39 ± 2,29 (6,9-22)
Sustrato del charco	arenoso	arenoso	arenoso	arenoso	arenoso	arenoso

Uso del microhábitat reproductivo

A partir de los datos registrados en el punto de captura de cada individuo, a lo largo del estudio, la temperatura del agua (TA) (°C) presentó variación significativa entre los distintos eventos reproductivos ($H=171,20$; $p<0,05$) (Fig. 2.3); y un valor medio de $24,90 \pm 3,99$ (17,6-32,3) °C. La distancia media al borde más cercano del charco (DB) fue de $3,87 \pm 2,91$ (0,24-11,37) m. Se encontró una correlación significativa entre la DB (m) y la profundidad del agua (cm) ($R^2=0,62$; $p<0,05$) (Fig. 2.4).

Los datos de TA (°C) y DB (m) para machos, hembras y parejas en amplexo de *M. montevidensis* en los cuerpos de agua reproductivos se resumen en la tabla 2.2. La mayoría de los machos se encontraron entre los 0 y 3 m de distancia al borde más cercano del charco (Fig. 2.5a) a temperaturas comprendidas entre los 25 y 29° C (Fig. 2.5b). Por otra parte, las hembras y las parejas en amplexo también predominaron en las zonas próximas al borde del charco (entre 0-3 m) (Fig. 2.6a y 2.6b) a temperaturas del agua comprendidas entre los 17 y 21 °C (Fig. 6a) y entre los 17 y 25 °C, respectivamente (Fig. 2.6b). El 73% de los machos hallados dentro de los cuerpos de agua reproductivos fueron no vocalizadores, mientras que el restante 27% estaba vocalizando. La DB media para los

vocalizadores fue de $2,92 \pm 2,47$ (0,28-10,0) m; mientras que para el resto de los machos fue de $4,27 \pm 3,03$ (0,3-11,37) m. Se encontró una asociación entre la actividad de vocalización con la DB (m) ($\chi^2=12,41$; $p<0,05$). Los machos vocalizadores utilizaron posiciones más cercanas al borde del charco en comparación con los no vocalizadores ($U=5440$; $p<0,05$) (Fig. 2.7). Finalmente, se encontraron diferencias significativas en el índice de condición corporal (BCI) entre machos vocalizadores y no vocalizadores, presentando los primeros un mayor BCI y por ende un mejor estado energético, independientemente del tamaño de los individuos ($U=0,99$; $p<0,05$) (Fig. 2.8).

TABLA 2.2. Datos de Temperatura del agua (°C) y Db (m) para machos, hembras y parejas en amplexo de *M. montevidensis* en los cuerpos de agua reproductivos en la BLR. REFERENCIAS: TA: Temperatura del agua (°C); DB: Distancia al borde más cercano del charco (m); SD: Desvío estándar.

	Machos	Hembras	Parejas en amplexo
TA \pm SD (Mín-Máx) (°C)	25,62 \pm 3,71 (19,2-32,3)	24,09 \pm 4,13 (17,6-31,5)	22,43 \pm 2,86 (18,3-29,9)
DB \pm SD (Mín-Máx) (m)	3,89 \pm 2,95 (0,28-11,37)	1,88 \pm 1,96 (0,3-8,3)	3,35 \pm 2,35 (0,24-10,7)

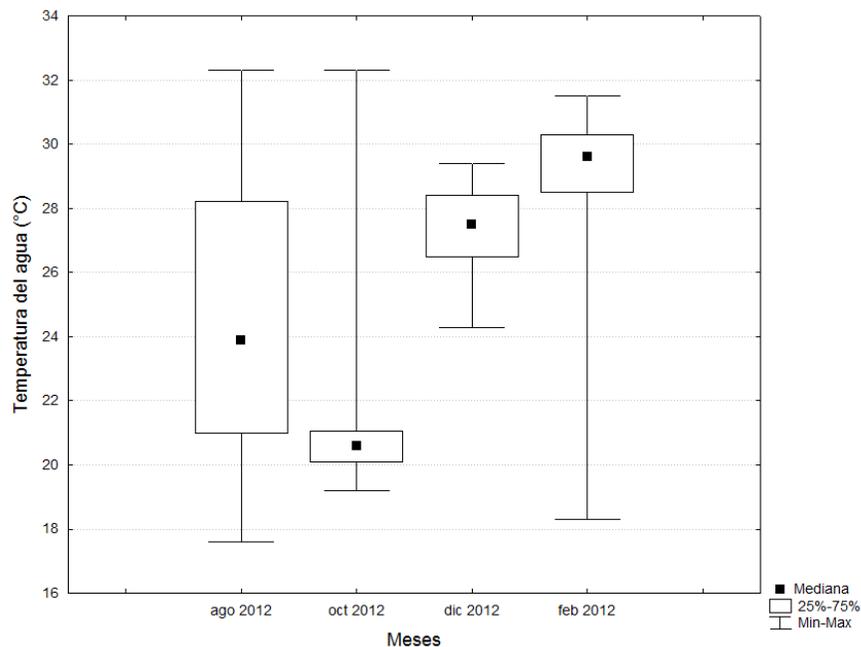


FIGURA 2.3. Variación mensual en la temperatura del agua registrada en los puntos de captura en los cuerpos de agua reproductivos de *M. montevidensis* en la BLR.

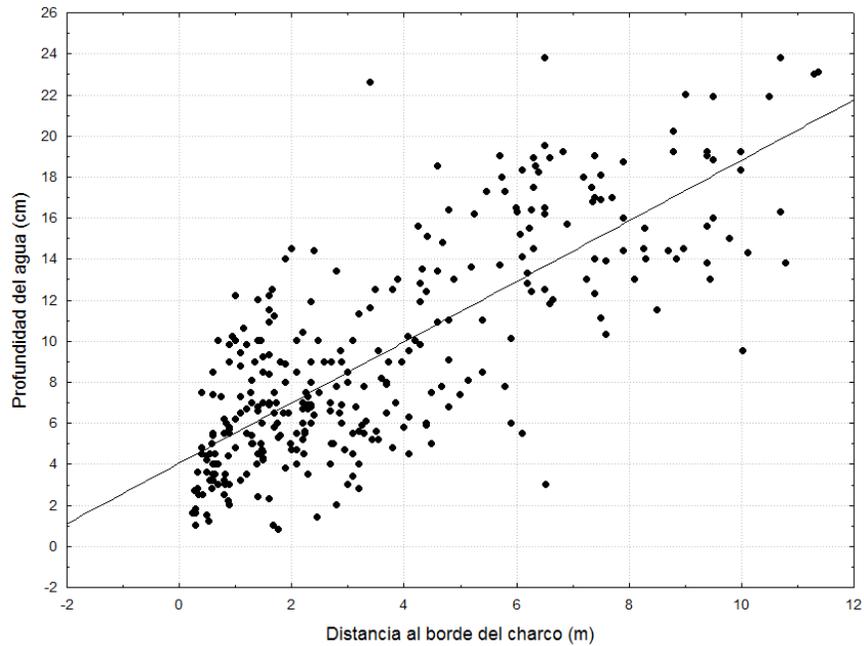


FIGURA 2.4. Modelo de regresión lineal entre la distancia al borde del charco (m) y la profundidad del agua registrada para individuos de *M. montevidensis* durante los eventos de actividad reproductiva en la BLR.

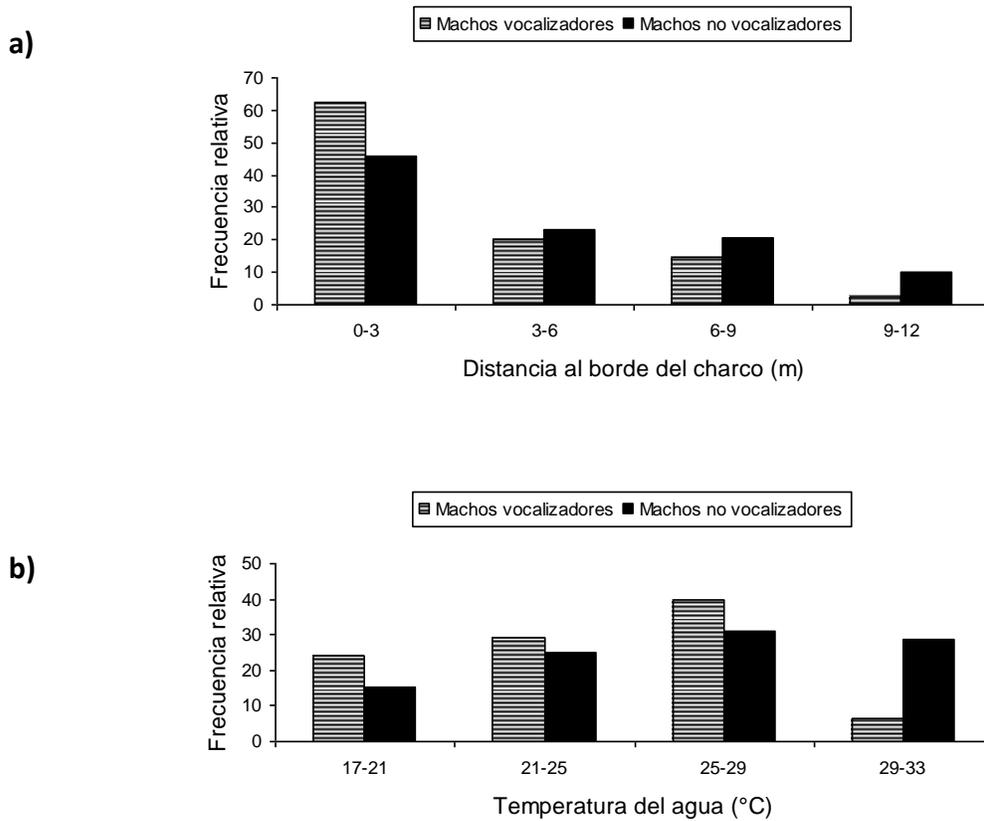
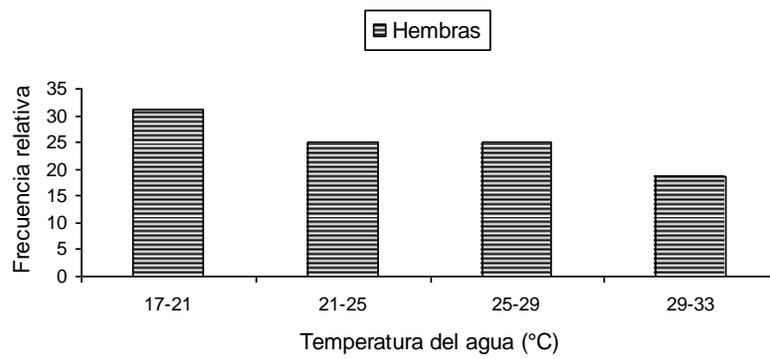
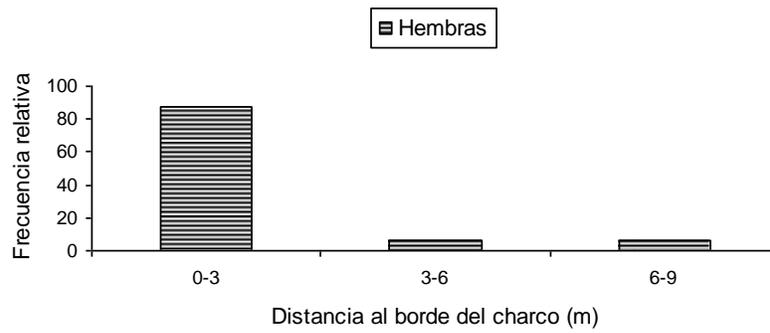


FIGURA 2.5. Distribución de frecuencias relativas de machos vocalizadores y no vocalizadores de *M. montevidensis* en la BLR, en función de: **a)** Distancia al borde del charco (m); **b)** Temperatura del agua (°C).

a)



b)

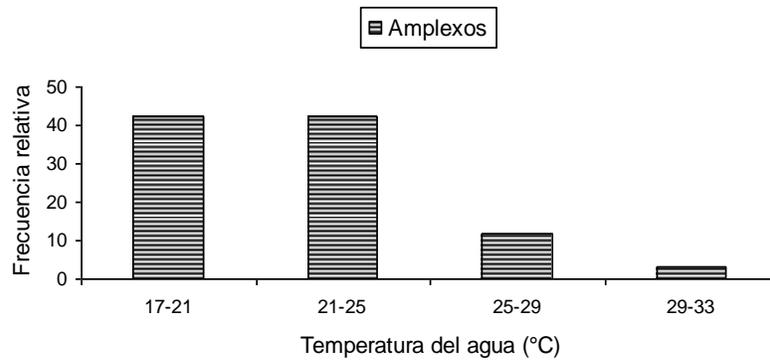
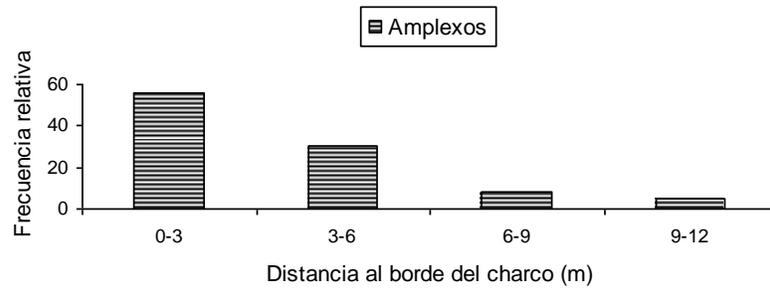


FIGURA 2.6. Distribución de frecuencias relativas de hembras y parejas en amplexo de *M. montevidensis* en la BLR, en función de la distancia al borde del charco (m) y de la temperatura del agua (°C). **a)** Hembras; **b)** Parejas en amplexo.

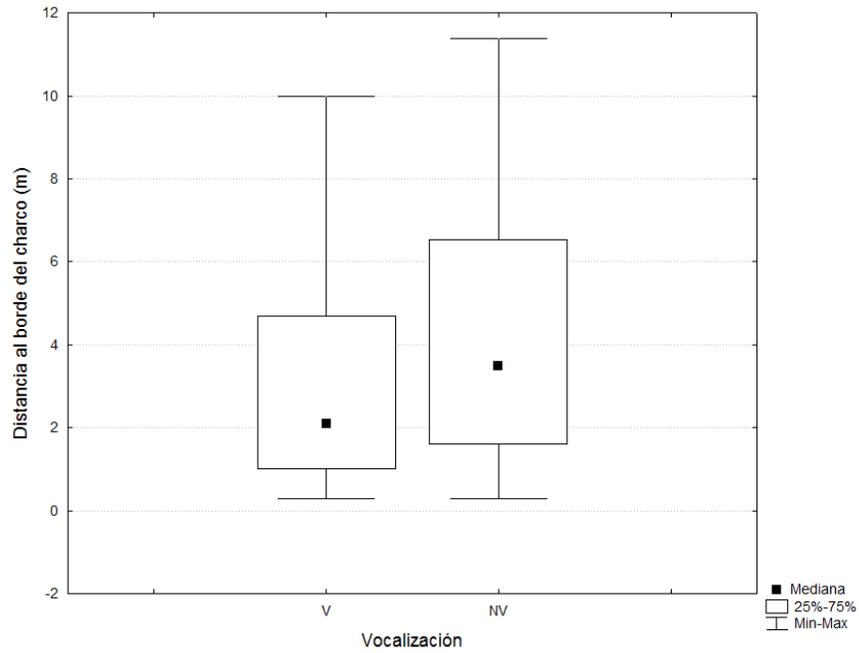


FIGURA 2.7. Variación en la distancia al borde del charco (m) entre machos vocalizadores y no vocalizadores de *M. montevidensis*.

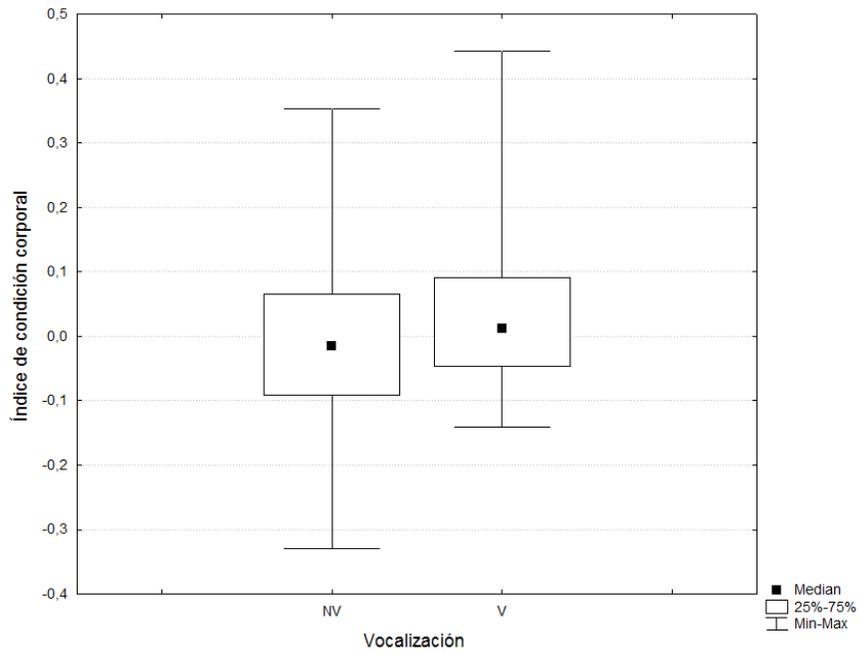


FIGURA 2.8. Variación en el Índice de condición corporal entre machos vocalizadores y no vocalizadores de *M. montevidensis*.

Manifestaciones comportamentales

Los comportamientos y el uso de la vegetación que presentaron los individuos de la especie durante la actividad de reproducción fueron categorizados para machos vocalizadores y no vocalizadores, hembras y parejas en amplexo. Para machos vocalizadores se agruparon en: 1. vocalizando flotando, 2. vocalizando sobre vegetación, 3. vocalizando sujeto a vegetación; y para los no vocalizadores en: 1. desplazándose, 2. entre la vegetación y 3. flotando o sobre vegetación. Por otra parte en hembras se consideraron dos categorías: 1. desplazándose y 2. entre la vegetación. Finalmente, para las parejas en amplexo los comportamientos exhibidos se agruparon en: 1. quietos en la vegetación, 2. nadando y 3. quietos en el espejo de agua. El 92% de los machos que se encontraron vocalizando en el cuerpo de agua, estaban sujetos a la vegetación (Fig. 2.9). Estos machos presentaron una postura corporal típica de vocalización que consiste en inflar el saco vocal, separar los brazos, sujetarse con ambas manos a la vegetación (principalmente gramíneas) y separar las piernas (Fig. 2.10). En cambio, la mayoría de los machos que no estaban vocalizando (72,5%) fueron observados principalmente desplazándose activamente dentro del charco (Fig. 2.11). Este mismo comportamiento fue observado en el 87,5% de las hembras en actividad reproductiva (Fig. 2.12). Finalmente, las parejas en amplexo presentaron los tres comportamientos observados en proporciones similares (Fig. 2.13). Sólo fueron observadas *in situ* dos parejas fijadas a la vegetación muy cerca del borde del charco a unos 2 cm de la superficie del espejo de agua.

Fueron observados cuatro combates entre machos que consistieron en luchas directas cuerpo a cuerpo. Este comportamiento se observó en machos que se encontraba vocalizando a menos de 10 cm de distancia uno del otro. Los machos que vocalizaban cerca, pero a distancias mayores (por ejemplo a 15, 18, 22 y 50 cm) no exhibieron este tipo de comportamientos. En dos de los combates se pudo constatar que los machos más pequeños se retiraron, resultando vencedores los machos de mayor tamaño (Tabla 2.3). En otro combate donde se enfrentaron individuos con tamaños similares (macho 1: LHC=22,19 mm; m=1,15 g; macho 2: LHC=22,38 mm; m=0,95 g), luego de unos minutos de pelea (ambos con los sacos vocales inflados), los machos se separaron y salieron nadando

en direcciones opuestas. En el mes de octubre en C2t se pudo observar por única vez a un macho (LHC=21,33; m=0,85g) intentando desplazar muy bruscamente a empujones a otro macho (LHC=21,38 mm; m= 1,05 g) que se encontraba en amplexo. El macho desplazador no tuvo éxito y luego de unos minutos la pareja en amplexo se alejó del lugar nadando rápidamente.

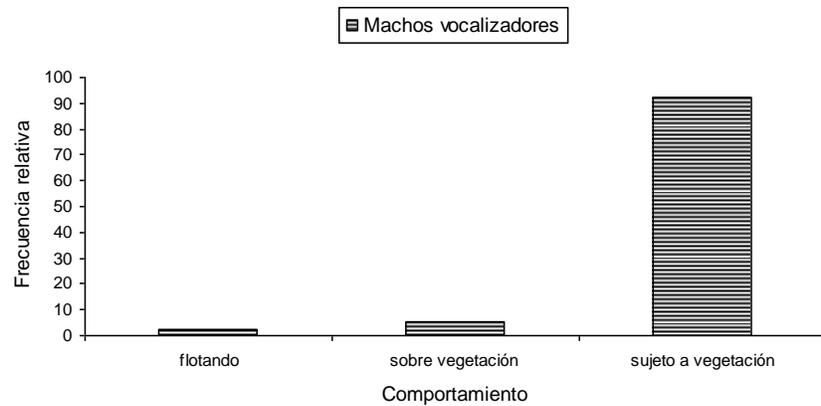


FIGURA 2.9. Distribución de frecuencias relativas de machos vocalizadores de *M. montevidensis* en la BLR, entre las distintas categorías de comportamientos observadas: **1.** flotando; **2.** sobre vegetación y **3.** sujeto a vegetación.



FIGURA 2.10. Macho de *M. montevidensis* vocalizando con postura de vocalización típica durante un evento de actividad reproductiva en agosto de 2012.

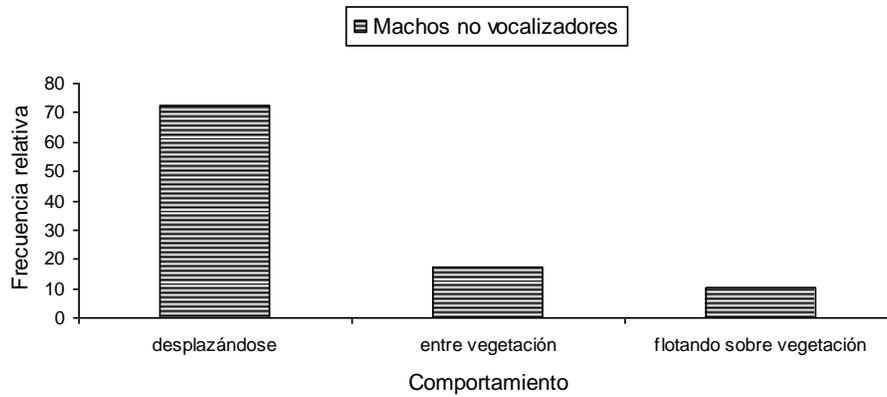


FIGURA 2.11. Distribución de frecuencias relativas de machos vocalizadores de *M. montevidensis* en la BLR, entre las distintas categorías de comportamientos observadas: 1. flotando; 2. sobre vegetación y 3. sujeto a vegetación.

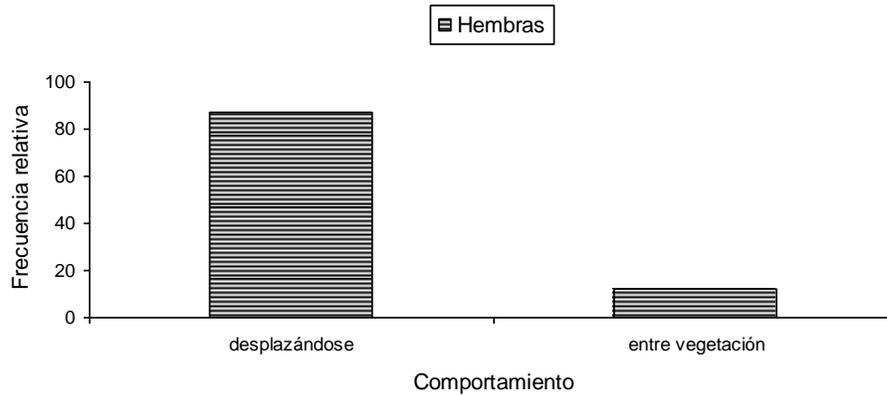


FIGURA 2.12. Distribución de frecuencias relativas de hembras de *M. montevidensis* en la BLR, entre las distintas categorías de comportamientos observadas: 1. desplazándose; 2. entre vegetación.

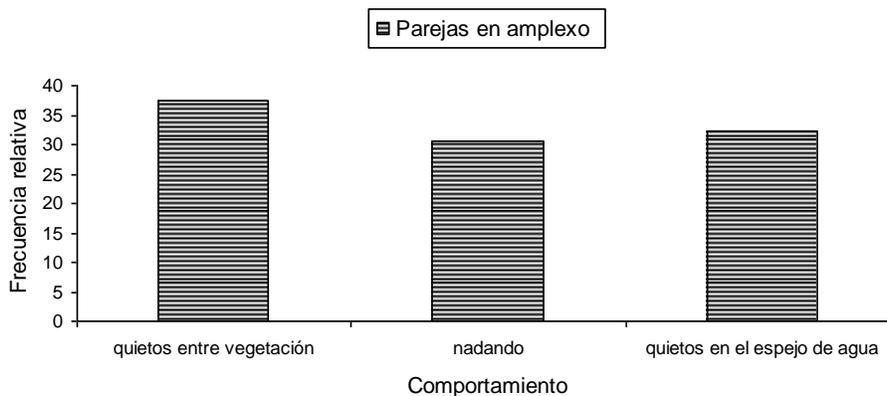


FIGURA 2.13. Distribución de frecuencias relativas de parejas en amplexo de *M. montevidensis* en la BLR, entre las distintas categorías de comportamientos observadas: 1. quietos entre vegetación; 2. nadando; 3. quietos en el espejo de agua.

TABLA 2.3. Datos de longitud hocico-cloaca (LHC) y masa (g) de machos de *M. montevidensis* observados en combate durante el estudio en la BLR. NOTA: en ambos casos la letra a representa al macho vencedor.

COMBATE 1	LHC (mm)	Masa (g)
Macho a	22,07	1,2
Macho b	20,15	0,9
COMBATE 2	LHC (mm)	Masa (g)
Macho a	21,55	1,15
Macho b	20,49	0,85

DISCUSIÓN

Caracterización y uso del microhábitat reproductivo

En la Barra de la Laguna de Rocha, *Melanophryniscus montevidensis* utilizó como sitios reproductivos cuerpos de agua temporales de tamaños variables, con sustratos arenosos y poco profundos (menores a 30 cm). El aspecto del agua fue claro en todas las instancias de actividad y el pH cercano a 7. La vegetación hidrófila fue la más representativa del sistema y muy abundante tanto dentro del charco (en el fondo y emergente) como fuera del mismo, volviéndose notoriamente más densa hacia los bordes. La utilización de charcos temporales con profundidades menores a los 50 cm durante el evento reproductivo se reportó previamente para otras poblaciones de la especie en Uruguay (Kolenc, 1988; Prigioni & Garrido, 1989; Alonzo *et al.*, 2002; Maneyro & Achaval, 2004). Adicionalmente, la preferencia por hábitats efímeros superficiales con densa vegetación, tanto dentro como fuera del agua, ya había sido observada en otras especies del género como *Melanophryniscus rubriventris* y *M. stelzneri* en Argentina (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Vaira, 2005; Pereyra *et al.*, 2011).

Recientemente se ha reconocido el papel del “hábitat complementario” en la determinación del uso de los sitios reproductivos en anuros, ya que se demostró que muchas especies solo se reproducen si los mismos poseen hábitats adyacentes específicos que les proporcionen refugio y alimento (Pope *et al.*, 2000; Blomquist & Hunter Jr., 2009; Lemckert & Mahony, 2010). En las cercanías de los cuerpos de agua donde se reproduce *M. montevidensis* se destaca la presencia de *Schoenoplectus californicus*, *Juncus acutus* y caraguatales, donde se han encontrado en reiteradas ocasiones individuos de la especie

refugiados durante el muestreo en la Barra de la Laguna de Rocha (capítulo 3). También se han observado animales forrajeando activamente en estas zonas adyacentes. En este sentido, Lemckert & Mahony (2010) proponen que las investigaciones vinculadas con los sitios de reproducción de anuros deben considerar los hábitats no reproductivos adyacentes asociados si se quiere lograr una correcta comprensión de la función de los hábitats.

La temperatura del agua presentó variación entre los distintos eventos de reproducción, siendo más alta en los meses de diciembre y febrero, donde se registraron las máximas temperaturas medias mensuales a lo largo del año de estudio. No obstante, cabe destacar que el agua se presentó de templada a cálida (medias por encima de los 20°C) en cada una de las instancias reproductivas y muy pocos individuos fueron encontrados en las zonas de los charcos donde las temperaturas fueron iguales o mayores a 30°C. Esto es esperable a causa de la condición ectoterma y la presencia de una piel delgada y desnuda, altamente permeable en estos animales (Wells, 2007). Adicionalmente, *M. montevidensis* presenta un rápido proceso de metamorfosis (un mes aproximadamente) (Maneyro & Carreira, 2012), al igual que el resto de las especies del género (Langone, 2002). Esto representa una ventaja para especies que se reproducen en hábitats temporales y puede estar relacionado con las altas temperaturas que prevalecen en aguas de escasa profundidad (Griffiths, 1997). La temperatura influye en el crecimiento y la tasa de desarrollo en larvas de anuros (Harkey & Semlitsch, 1988); por lo tanto, aguas más cálidas podrían acelerar el desarrollo larval en cuerpos de agua con duración corta e impredecible.

Por otra parte, los machos, hembras y parejas en amplexo se encontraron mayoritariamente en las zonas menos profundas cerca del borde del charco, donde la vegetación sumergida y emergente fue notoriamente más densa. Para poder entender este patrón observado, se proponen dos posibles explicaciones no excluyentes. En primer lugar, la vegetación podría proporcionar heterogeneidad al hábitat brindando refugios frente a potenciales depredadores (Kopp *et al.*, 2006; Pereyra *et al.*, 2011). Apoyando esta idea, diversos trabajos han encontrado que la riqueza de especies de anuros se asocia positivamente con el grado de vegetación emergente en el borde del charco (Lane *et al.*,

2007). Otra posible explicación estaría vinculada con el hecho de que una densa vegetación podría generar un menor gradiente térmico, evitando un aumento rápido de la temperatura del agua, reduciendo el riesgo de desecación (Pereyra *et al.*, 2011). Estos dos factores podrían estar influyendo en la preferencia de los individuos de *M. montevidensis* por determinados sitios dentro de los cuerpos de agua reproductivos en la BLR.

Los machos vocalizadores fueron encontrados en regiones más cercanas al borde del charco reproductivo en relación con los no vocalizadores. Kolenc (1988) había reportado que los machos de la especie vocalizaban desde las orillas. Como se mencionó anteriormente, la densa vegetación presente en esta zona podría ser utilizada como refugio y esto sería ventajoso ya que durante la actividad de vocalización los machos generalmente se vuelven más conspicuos frente a los depredadores (Wells, 2007). Adicionalmente, la vegetación hidrófila del charco (principalmente las gramíneas) es utilizada por los machos como apoyo o sujeción durante las vocalizaciones. Patrones similares fueron encontrados en *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* de Argentina, donde los machos se observaron vocalizando en las orillas, apoyados en la vegetación y permaneciendo ocultos si la cobertura vegetal era lo suficientemente densa (Bustos-Singer & Gutiérrez, 1997). En las agregaciones reproductivas de *M. montevidensis* los machos superan ampliamente en número a las hembras, por lo cual su éxito reproductivo dependerá de la capacidad para localizar a las hembras (Wells, 1977). En consecuencia, ocupar posiciones cercanas al borde del charco sería una buena estrategia para los machos vocalizadores ya que podrían interceptar primero a las hembras grávidas que van llegando al charco en busca de amplexos, en respuesta a sus llamados. Finalmente, se encontró que independientemente del tamaño corporal, los machos de *M. montevidensis* vocalizadores presentaron mayor índice de condición corporal que los no vocalizadores y por ende un mejor estado energético. Este resultado es esperado “*a priori*” ya que la actividad de vocalización es energéticamente muy costosa y requiere de una fuerte asignación de recursos por parte de los machos (Leary *et al.*, 2004), que deben poseer buenas reservas energéticas. Para ello, estos machos probablemente destinen una parte importante de la energía durante el período de inactividad a mejorar el estado corporal (Reading, 2007) en lugar de invertirla toda en crecimiento.

La idoneidad de un sitio reproductivo para una especie puede evaluarse a través de la presencia de la misma en el sitio (Goldberg *et al.*, 2006). En el presente estudio, los cuerpos de agua identificados como sitios reproductivos para *M. montevidensis* fueron utilizados en varios eventos reproductivos; lo cual indica que la puesta de huevos en estos charcos no constituye un evento ocasional. Adicionalmente, reforzando la idea anterior, fueron identificados los mismos individuos de la especie, utilizando el mismo charco específico en distintos meses de actividad reproductiva a través de fotoidentificación (Capítulo 1). Un patrón similar fue encontrado en *M. stelzneri* en las sierras de Córdoba, Argentina (Pereyra *et al.*, 2011). Por lo expuesto anteriormente se podría considerar que los cuerpos de agua reproductivos utilizados por *M. montevidensis* en la BLR serían sitios muy apropiados para su actividad reproductiva y posterior desarrollo larval.

Manifestaciones comportamentales

En la población de estudio sólo el 27% de los machos encontrados fueron vocalizadores, mientras que el restante 73% fueron no vocalizadores. Los machos vocalizadores utilizaron principalmente ejemplares de *Hydrocotyle* y gramíneas como apoyo y sujeción mientras cantaban. El 92% de estos machos fueron observados sujetos a la vegetación y en todos los casos presentaron una postura típica de vocalización. El uso de la vegetación durante la actividad de vocalización se observó previamente en *M. montevidensis* (Alonzo *et al.*, 2002; Maneyro & Carreira, 2012); en otras especies del género (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Vaira, 2005), así como en otras especies de anuros (Ávila *et al.*, 2004; Zank *et al.*, 2008). Por otra parte, los machos no vocalizadores también fueron hallados sobre vegetación o entre ella. No obstante, la gran mayoría (72,5%) se observó desplazándose activamente por el cuerpo de agua. Wells (1977) plantea que en agrupaciones de reproductores explosivos cuando la densidad de machos es alta, estos deben alternar la actividad de vocalización con otras estrategias comportamentales para obtener amplexos. Dentro de estas tácticas alternativas se distinguen la búsqueda activa de hembras, combates con otros machos o el desplazamiento de machos en amplexo para robar a la hembra (Pombal & Haddad, 2005). En los sitios reproductivos fueron observadas densas agregaciones de individuos y los

machos de *M. montevidensis* siempre fueron más abundantes que las hembras. Consecuentemente, los machos que se encontraron desplazándose dentro del charco, podrían estar buscando activamente hembras grávidas. Comportamientos alternativos ya han sido observados en muchas otras especies del género como *M. stelzneri*, *M. rubriventris*, *M. cambaraensis* y *M. montevidensis* de Argentina; siendo la búsqueda activa de hembras la estrategia más utilizada por los machos (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Vaira, 2005; Goldberg *et al.*, 2006; Caorsi, 2011; Cairo *et al.*, 2008).

La mayoría de las hembras de *M. montevidensis* también se encontraron moviéndose activamente en el cuerpo de agua. No obstante, a lo largo de los eventos reproductivos el porcentaje de hembras grávidas observado fue muy bajo (sólo un 18,2%), por lo cual sería necesario efectuar más estudios para comprender el comportamiento de las mismas. Por otra parte, fueron observadas 59 parejas en amplexo. Durante el abrazo nupcial, la pareja de *M. montevidensis* flota en el cuerpo de agua ayudándose con la vegetación emergente y luego se sumerge a intervalos regulares al fondo del charco para depositar en la vegetación sumergida un grupo de huevos (Kolenc, 1988; Alonzo *et al.*, 2002). En este estudio, no fue posible observar el comportamiento de amplexo completo hasta el desove "*in situ*". Las parejas se hallaron nadando o quietas en la vegetación o en el espejo de agua, probablemente en alguna de las etapas del comportamiento antes descrito. Cabe destacar que no fueron observados amplexos entre machos, ni amplexos múltiples (una hembra abordada por varios machos), lo cual puede ser frecuente en agregaciones de reproductores explosivos (Wells, 1977). En una sola oportunidad se observó un macho de la especie intentando desplazar a otro que se encontraba en amplexo. Este comportamiento agresivo es común en machos con reproducción explosiva y fue reportado previamente en otras especies del género (Vaira, 2005, Goldberg *et al.*, 2006, Caorsi, 2011). Sólo fueron observadas "*in situ*" dos puestas fijas a gramíneas sumergidas muy cerca del borde del charco a unos 2 cm de la superficie del espejo de agua. Un patrón similar se encuentra en *M. stelzneri* donde los huevos son depositados cerca de la orilla a poca profundidad y adheridos a la vegetación (Bustos-Singer & Gutiérrez, 1997). La utilización de la vegetación tanto para sujeción durante la vocalización

y el amplexo, como para el soporte de los huevos, resaltaría la importancia de su presencia en los cuerpos de agua reproductivos utilizados por *M. montevidensis*.

Además del comportamiento agresivo de macho desplazador, fueron observados cuatro combates cuerpo a cuerpo entre machos de *M. montevidensis*. Interacciones físicas entre machos de la especie han sido observadas en otras poblaciones de Uruguay (Prigioni & Garrido, 1989; Alonzo *et al.*, 2002). Las luchas se desencadenaron cuando los individuos vocalizaban a menos de 10 cm uno del otro. Para una población de la especie del este de Uruguay, se encontraron resultados similares ya que las exhibiciones agresivas se desencadenaron cuando los machos transgredieron los 10 cm de separación (Alonzo *et al.*, 2002). Zank *et al.* (2010) plantean que el mantenimiento de una distancia mínima entre los machos vocalizadores es importante cuando la densidad de machos es grande ya que propicia una disminución en el número de interacciones agresivas. En dos de los combates observados en el presente trabajo se pudo constatar que los machos más pequeños se retiraron vencidos luego de luchar por unos minutos con machos más grandes. Cuando los machos presentaron tamaños corporales similares, ninguno resultó vencedor ya que luego de varios minutos de combate estos se separaron y nadaron simultáneamente en direcciones opuestas. En una población de *Pseudis minutus* en Brasil, no se observaron comportamientos agresivos cuando la diferencia de tamaños fue considerable, ocurriendo solamente una interacción acústica entre los individuos. Sin embargo cuando los machos presentaron tamaños similares hubo interacción acústica y física, resultando de ésta un vencedor (Zank *et al.*, 2008). Sin embargo, esta especie, a diferencia de *M. montevidensis*, es de reproducción prolongada y estacional. Por lo tanto, el comportamiento observado en *M. montevidensis* puede estar relacionado con la dinámica reproductiva explosiva, ya que debido a la estrecha ventana temporal de la reproducción, los machos invierten todos sus recursos en ese evento y no necesitan “ahorrar” energía evitando pelear con machos más grandes, donde tienen bajas probabilidades de ganar una pareja. En cambio, especies con reproducción prolongada evitan este tipo de enfrentamientos, ya que deben focalizar su energía en el mantenimiento de la actividad de vocalización sostenida durante períodos más extensos, ya que su éxito reproductivo depende de la persistencia en el sitio de reproducción (Wells, 1977).

En base a los resultados obtenidos, se podría confirmar que además de la vocalización como estrategia para atraer a las hembras coespecíficas, los machos de *M. montevidensis* en la BLR utilizan estrategias comportamentales alternativas cuando sus densidades son altas, principalmente la búsqueda activa de hembras.

CONCLUSIONES

En la BLR, *Melanophryniscus montevidensis* utiliza como sitios reproductivos cuerpos de agua temporales de tamaños variables, con sustratos arenosos y poco profundos. La vegetación hidrófila fue la más representativa y muy abundante tanto dentro como fuera del charco, y fue utilizada tanto para sujeción durante la vocalización y el amplexo como para el soporte de los huevos. El “hábitat complementario” jugaría un papel en la determinación del uso de los sitios reproductivos en la población, ya que les proporciona, entre otras cosas, sitios de refugio. No se puede rechazar la hipótesis propuesta ya que los machos, hembras y parejas en amplexo prefieren las zonas cercanas al borde del charco con vegetación más densa que posiblemente les brinda refugio y además genera un menor gradiente térmico, reduciendo el riesgo de desecación. Los machos vocalizadores ocuparon posiciones más cercanas al borde del charco y además presentaron un mejor estado energético en relación con los no vocalizadores. Permanecer en estas zonas sería una buena estrategia (considerando las altas densidades de machos encontradas en los sitios reproductivos) ya que los que permanecen más cerca del borde podrían interceptar primero a las hembras grávidas que van llegando. Además de la vocalización como estrategia para atraer a las hembras coespecíficas, los machos utilizaron tácticas alternativas para obtener pareja como la búsqueda activa de hembras y comportamientos agresivos como el de macho desplazador y combates físicos. Todos estos comportamientos son comunes en anuros con dinámica reproductiva explosiva como la exhibida por *M. montevidensis*. Considerando que la pérdida, fragmentación y degradación del hábitat es una de las principales causas propuestas para la disminución observada en las poblaciones de la especie en el país, incorporar datos vinculados con la caracterización y uso de los microhábitats reproductivos en planes de manejo resultaría crucial para una estrategia de conservación a futuro en Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonzo, A., Calixto, G. & Mato, J. 2002. Comportamiento sexual e interacciones intraespecíficas entre machos en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura – Bufonidae). En: *Memorias del VI Congreso nacional y IV Congreso internacional de Profesores de Biología: Desafíos en la Enseñanza de la Biología*, 156-163. Lavalleya, Uruguay.
- Ávila, R. W. & Ferreira, V. L. 2004. Riqueza e densidade de vocalizações de anuros (Amphibia) em uma área urbana de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 887-892.
- Bertoluci, J. & Trefaut Rodrigues, M. 2002. Utilização de habitats reprodutivos e micro-habitats de vocalização em uma taxocenose de anuros (amphibia) da Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 42: 287-297.
- Blomquist, S. M. & Hunter Jr., M. L. 2008. A multi-scale assessment of habitat selection and movement patterns by northern leopard frogs (*Lithobates [Rana] pipiens*) in a managed forest. *Herpetological Conservation and Biology*, 4: 142-160.
- Boelter, R. A. 2004. Predação de anuroa nativos pela rã-touro (*Rana catesbeiana*: Ranidae) no sul de Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidad Federal de Santa Maria (UFSM, RS). Centro de Ciências Naturais e Exactas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal.
- Bustos Singer, R. & Gutiérrez, M. 1997. Reproducción y desarrollo larval del sapo enano: *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenbergh, 1875) (Anura: Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología*, 11: 21-30.
- Cairo, S. L., Zalba, S.M. & Úbeda, C. A. 2008. Reproductive behaviour of *Melanophryniscus* sp. From Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). *South American Journal of Herpetology*, 3:10-14.
- Cairo, S. L., Zalba, S.M. & Úbeda, C. A. 2013. Reproductive pattern in the southernmost populations of South American redbelly toads. *Journal of Natural History*, 47: 2125-2134.
- Caorsi, V. Z. 2011. Comportamento reprodutivo de *Melanophryniscus cambaraensis* (Anura: Bufonidae) na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, Rio Grande do

- Sul, Brasil. Undergraduate Thesis. Universidade Federal de Rio Grande do Sul. 18 pp.
- Collins, J.P. & Crump, M.L. 2009. Extinction in our times. Global amphibian decline. Oxford University Press.
- Daza-Vaca J. D. & Castro-Hererra, F. 1999. Hábitos alimenticios de la rana toro (*Rana catesbeiana*) Anura: Ranidae en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana*, XXIII: 265-274.
- DINAMA. 2010. *Plan de mediano plazo 2010/2014*. (Hemisferio Sur, Ed.) (1st ed., p. 118). Montevideo, Uruguay.
- Eterovick, P. C., Rievers, C. R., Kopp, K., Wachlevski, M., Franco, B. P., Dias, C. J., Barata, I. M., Ferreira, A. D. M. & Afonso, L. G. 2010. Lack of phylogenetic signal in the variation in anuran microhabitat use in southeastern Brazil. *Evolutionary Ecology*, 24: 1-24.
- Goldberg, F. J., Quinzio, S. & Vaira, M. 2006. Oviposition-site selection by the toad *Melanophryniscus rubriventris* in an unpredictable environment in Argentina. *Canadian Journal of Zoology*, 84: 699-705.
- Griffiths, R. A. 1997. Temporary ponds as amphibian habitats. *Acquatic conservation: Marine and freshwater ecosystems*, 7:119-126.
- Harkey, G. A. & Semlitsch, R. D. 1988. Effects of temperature on growth, development, and color polymorphism in the Ornate Chorus Frog *Pseudacris ornata*. *Copeia*, 1988: 1001-1007.
- Johnson, J. R., Mahan, R. D. & Semlitsch, R.D. 2008. Seasonal terrestrial microhabitat use by gray treefrogs (*Hyla versicolor*) in Missouri Oak-Hickory forests. *Herpetologica*, 64: 259-269.
- Kolenc, F. 1988. Anuros del género *Melanophryniscus* en la República Oriental del Uruguay. *Aquarama*, 5 : 16-21.
- Kopp, K., Wachlevski, M. & Eterovick, P. C. 2006. Environmental complexity reduces tadpole predation by water bugs. *Canadian Journal of Zoology*, 84: 136-140.

- Krishnamurthy, S. V. 2003. Amphibian assemblages in undisturbed and disturbed areas of Kudremukh National Park, central Western Ghats, India. *Environmental Conservation*, 30: 274-282.
- Lane, S. J., Hamer, A. J. & Mahony, M. J. 2007. Habitat correlates of five amphibian species and of species-richness in a wetland system in New South Wales, Australia. *Applied Herpetology*, 4: 65-82.
- Langone, J. 2002. *Melanophryniscus*, interesantes sapitos uruguayos. Documentos de Divulgación. Museo Nacional de Historia Natural y Antropología, 4: 1-11.
- Langone, J. 2004. *Melanophryniscus montevidensis*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. Disponible en: www.iucnredlist.org. Último acceso: 31 de enero de 2014.
- Leary, C. J., Jeesop, T. S., Garcia, A. M. & Knapp, R. 2004. Steroid hormone profiles and relative of body condition of calling and satellite toads: implications for proximate regulation of behavior anurans. *Behavioral Ecology*, 15: 313-320.
- Lemckert, F. & Brassil, T. 2000. Movements and habitat use of the endangered giant barred river frog (*Mixophyes iteratus*) and the implications for its conservation in timber production forests. *Biological Conservation*, 96: 177-184.
- Lemckert, F. & Mahony, M. 2010. The relationship among multiple-scale habitat variables and pond use by anurans in northern New South Wales, Australia. *Herpetological Conservation and Biology*, 5:537-547.
- Maneyro, R. & Achaval, F. 2004. *Melanophryniscus montevidensis* (Darwin's Toad). Albino Larvae. *Herpetological Review*, 35:26.
- Maneyro, R. & Carreira, S. 2012. Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la fuga, Montevideo.
- Muñoz-Guerrero, J., Serrano, V. H. & Ramírez-Pinilla, M. P. 2007. Uso de microhábitat, dieta y tiempo de actividad en cuatro especies simpátricas de ranas hílidas neotropicales (Anura: Hylidae). *Caldasia*, 29: 413-425.
- Pereyra, L. C., Lescano, J. N. & Leynaud, G. C. 2011. Breeding-site selection by red-belly toads, *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae), in Sierras of Córdoba, Argentina. *Amphibia-Reptilia*, 32: 105-112.

- Pombal, J. P. Jr. & Haddad, C. F. B. 2005. Estratégias e modos reprodutivos em anuros. En: Nascimento, L. B. & Oliveira, M. E (Eds.). *Herpetologia do Brasil II* (pp. 101-116). Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- Pope, S. E., Fahrig, L. & Merriam, H. G. 2000. Landscape complementation and metapopulation effects on leopard frog populations. *Ecology*, 81: 2498-2508.
- Prigioni, C. & Garrido, R. R. 1989. Algunas observaciones sobre la reproducción de *Melanophryniscus stelzneri montevidensis* (Anura, Bufonidae). *Boletín de la Sociedad zoológica del Uruguay (Actas de las Jornadas de Zoología del Uruguay 2)*, 5: 13-14.
- Reading, C. J. 2007. Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia*, 151: 125-131.
- Rittenhouse, T. A. G. & Semlitsch, R. D. 2007. Distribution of amphibians in terrestrial habitat surrounding wetlands. *Wetlands*, 27: 153-161.
- MVOTMA. 2014. Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Paisaje protegido Laguna de Rocha. Disponible en: www.mvotma.gub.uy. Último acceso 10 de marzo de 2014.
- Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P. & Young, B.E. 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; and Conservation International, Arlington, Virginia, USA.
- Toranza, C. & Maneyro, R. 2013. Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa*, 12:97-106.
- Vaira, M. 2005. Annual variation of breeding patterns of the toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Vellard, 1947). *Amphibia-Reptilia*, 26:193-199.
- Vasconcelos, T. & Rossa-Feres, D. 2008. Habitat Heterogeneity and Use of Physical and Acoustic Space in Anuran Communities in Southeastern Brazil. *Phyllomedusa*, 7:127-142.
- Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25: 666-693.
- Wells, K. D. 2007. The ecology & behavior of amphibians. Chicago (IL): University of Chicago Press.

- Zank, C., Di-Bernardo, M., Lingnau, R., Colombo, P., Fusinatto, L. A. & da Fonte; L. F. M. 2008. Calling activity and agonistic behavior of *Pseudis minuta* Günther, 1858 (Anura, Hylidae, Hylinae) in the Reserva Biológica do Lami, Porto Alegre, Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 3: 51-57
- Zank, C., Di-Bernardo, M. , Maneyro, R., Colombo, P., Fusinatto, L. & da Fonte, L.F.M. 2010. Spatial and temporal distribution of *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae, Hylinae) and environmental variables related to its reproductive activity in Reserva Biológica do Lami, southern Brazil. *Iheringia (Série Zoologia)*, 100: 145-150.

CAPÍTULO 3. “Análisis de los movimientos en una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) a través del reconocimiento individual por fotoidentificación”

INTRODUCCIÓN

El estudio de los patrones de movimientos permite conocer distintos aspectos de la historia natural de los organismos, como sitios de forrajeo, refugio, reproducción, capacidad de dispersión y distancia de migración, entre otros (Wells, 2007). En comparación con algunos vertebrados terrestres, los anfibios no son animales muy ágiles, aunque recursos importantes del hábitat para ellos (como los sitios de reproducción y alimentación) están separados en espacio y tiempo (Sinsch, 1988). En general, se caracterizan por presentar un patrón de movimiento típico con muchos movimientos cortos y pocos largos (Wells & Wells, 1976), una baja capacidad de dispersión y una alta fidelidad de sitio (Smith & Green, 2005; Caldwell & Shepard, 2007). Posiblemente los movimientos de los anfibios más comúnmente reconocidos son las migraciones estacionales hacia y desde las áreas de actividad reproductiva (Semlitsch, 2008). Estos desplazamientos rara vez exceden unos pocos cientos de metros, no obstante, algunas especies pueden recorrer grandes distancias hasta su sitio de reproducción tradicional (Stuart *et al.*, 2008).

En anuros, los movimientos son determinados tanto por factores intrínsecos como extrínsecos (Vitt & Caldwell, 2009). Por ser ectotermos y poseer una piel permeable, son muy sensibles a las variables ambientales, principalmente a la temperatura y humedad, para regular su actividad (Guimarães *et al.*, 2011; Sluys & Guido-Castro, 2011). En consecuencia, los movimientos son mayores durante los días lluviosos o húmedos, (Husté *et al.*, 2006) y usualmente se producen de noche, cuando la humedad alta reduce el riesgo de desecación (Vitt & Caldwell, 2009; Santos & Grant, 2011). Durante el día se refugian en lugares sombreados y húmedos (por ej: vegetación del suelo, cuevas naturales o construidas, etc) para evitar las temperaturas extremas (Tozetti & Toledo, 2005; Yu *et al.*, 2010). Por otra parte, dentro de una especie, grandes tamaños corporales permiten mayores distancias de movimientos (Lemckert, 2004; Tozetti & Toledo, 2005). Esto se debe a que individuos más pequeños tienen menor capacidad locomotora y son propensos a perder el agua más rápidamente, por lo tanto, recorren distancias más cortas (Semlitsch, 2008). Las distancias recorridas también pueden variar en función de las

estaciones del año, las estrategias de forrajeo, la edad y el sexo de los individuos (Tozetti & Toledo, 2005).

En estudios de patrones de movimientos de anuros, para el seguimiento de los individuos, frecuentemente son utilizadas técnicas como el Radiotracking, los Carreteles de Hilo y el Marcaje y Recaptura (M-RC) (Heyer *et al.*, 1994; Bradfield, 2004; Bailey, 2004; Iwai, 2013). Este último método es el más común y consiste en marcar a los animales, liberarlos y luego recapturarlos a intervalos variables. Los movimientos más largos se hacen a menudo más aparentes con largos intervalos de recapturas (Wells, 2007). Existen varios métodos artificiales para marcar anfibios como amputación de falanges, tatuajes, *transponders* integrados pasivos (PIT) y etiquetas fluorescentes, entre otros (Heyer *et al.*, 1994; Ferner, 2007). Varios estudios indican que la aplicación de este tipo de marcas puede derivar en una mortalidad inducida o provocar efectos subletales sobre el *fitness* de los animales (Bradfield, 2004; Sacchi *et al.*, 2010). Alternativamente, la Fotoidentificación (FI) es un método de marcaje natural que consiste en registrar fotográficamente patrones de diseño-coloración únicos para cada animal (Bradfield, 2004). Es una de la técnicas emergentes más prometedoras por ser rápida, mínimamente invasiva, barata, aplicable a todas las clases de tamaño de postmetamorfos y por permitir la identificación individual a largo plazo (Beausoleil *et al.*, 2004; Sacchi *et al.*, 2010). Actualmente, el número de estudios que involucran la FI de anfibios viene creciendo a un ritmo acelerado (ver por ejemplo Bradfield, 2004; Bailey, 2004; Miranda *et al.*, 2005; Del Lama *et al.*, 2011; Ribeiro & Rui, 2011; Caorsi *et al.*, 2012; Cairo *et al.*, 2013).

Melanophryniscus montevidensis (Philippi, 1902), es un bufónido perteneciente al género neotropical *Melanophryniscus*. Es una especie diurna (pero ver Capítulo 1), de reproducción explosiva que habita zonas arenosas costeras (Maneyro & Carreira, 2012). Se encuentra amenazada a nivel local y global debido a su drástica disminución poblacional a causa de la destrucción y degradación del hábitat, su acotada extensión de ocurrencia (sur de Uruguay y costa sur de Rio Grande do Sul, Brasil) y la creciente urbanización de las zonas costeras, entre otros factores (Langone, 2004).

En el presente estudio se analizan los movimientos de los individuos de *M. montevidensis* en la Barra de la Laguna de Rocha (BLR) (Rocha, Uruguay). El estado de

conservación de esta especie impide que las técnicas de marcaje invasivo sean aceptables; por lo cual se utilizó la FI a partir del patrón de coloración ventral de los sapos para el reconocimiento individual. Esta técnica ha sido validada en estudios anteriores para esta especie (Elgue *et al.*, 2013) y para otros miembros del género *Melanophryniscus* en Brasil y Argentina (Caorsi *et al.*, 2012; Cairo *et al.*, 2013; Abadie, 2012). No obstante, estudios que involucren FI de marcas naturales para lograr estimaciones de parámetros poblacionales en poblaciones de anuros silvestres son muy escasos (ver por ej. Miranda *et al.*, 2005).

El objetivo general de este capítulo es analizar los movimientos de los individuos de *Melanophryniscus montevidensis* en la Barra de la Laguna de Rocha utilizando la Fotoidentificación asistida por software como técnica de reconocimiento individual. Los objetivos específicos son: 1) Analizar la proporción de sexos en la población; 2) Estudiar la correlación entre la actividad de los individuos y las variables climáticas; 3) Analizar la potencial existencia de una correlación entre la Masa (g), LHC (mm) y el tiempo de recaptura (RC) de los individuos con la distancia recorrida en metros.

Se pondrán a prueba las siguientes hipótesis:

1. El desplazamiento en *M. montevidensis* está condicionado por el tamaño corporal.

Predicción: los animales más grandes son los que logran desplazarse a mayores distancias.

2. Las precipitaciones y la humedad influyen en la actividad de *M. montevidensis*.

Predicción: se espera que haya más individuos fuera de los refugios moviéndose activamente por el ambiente en los meses húmedos y lluviosos.

3. El evento reproductivo condiciona la razón de sexos en *M. montevidensis*

Predicciones:

a. Razón de sexos sesgada a favor de los machos durante los eventos de reproducción.

b. Razón de sexos más equilibrada fuera de los períodos reproductivos.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Área de estudio

El estudio se desarrolló en la Barra de la Laguna de Rocha (BLR) (34° 40' 02" Sur; 54° 14' 00" Oeste), Departamento de Rocha, Uruguay (Fig. 1.1, capítulo 1). Esta zona forma parte del Paisaje Protegido Laguna de Rocha del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (DINAMA, 2010). El área posee sistemas dunares costeros y praderas inundables asociadas, donde se forman los cuerpos de agua temporales utilizados por *M. montevidensis*.

Trabajo de campo y toma de datos

Se realizaron salidas mensuales de tres días de duración cada una entre el período marzo de 2012 y febrero de 2013. Previamente se efectuaron cuatro salidas piloto al área de estudio (tres entre setiembre-noviembre de 2011 y una en febrero de 2012). Fueron seleccionados cinco sitios en la BLR para el monitoreo. Estos sitios que incluyen el charco y zonas aledañas fueron identificados como C1, C2c, C2t, C3 y C4 (Fig. 3.1a; tabla I). Los datos de temperatura media (°C), precipitación total acumulada (mm) (Fig. 1.3, capítulo 1) y humedad relativa media (%) en la zona durante el período de muestreo fueron obtenidos a partir de la estación meteorológica n°865650 de Rocha, ubicada a 20 km del área de estudio (<http://www.tutempo.net/clima/ROCHA/865650.htm>).

Durante cada visita a la BLR, los individuos fueron buscados durante el día en los sitios seleccionados, a través de búsqueda visual activa (Heyer *et al.*, 1994), controlada por tiempo. La técnica se estandarizó de la siguiente manera: 1) cuatro personas se distribuyeron aleatoriamente por el ambiente, buscando activamente animales, por un tiempo inicial de 20 minutos; 2) si al transcurrir este tiempo no aparecía ningún ejemplar se daba por terminada la búsqueda en ese lugar; 3) en el caso contrario, el trabajo continuaba hasta que pasaran 15 minutos consecutivos sin hallar individuos (contabilizándose este tiempo a partir del último animal encontrado).

Todos los individuos hallados fueron capturados, colocados en frascos con un poco de agua del lugar y etiquetados individualmente con un número de referencia. Adicionalmente, en el momento de captura se registró la zona específica donde se

encontraba cada animal (Fig. 3.1b) y el comportamiento que presentaba cada individuo; es decir si estaba activo (por ej. en actividad reproductiva, caminando) o refugiado. Posteriormente se midió la longitud hocico-cloaca (LHC) con un calibre digital y se determinó su masa utilizando un dinamómetro (Pesola®). Al mismo tiempo, se registró el patrón ventral de coloración de cada sapo a través de fotografías utilizando dos cámaras NIKON (modelos: L810 y P500; resolución: 16.0 y 12.1 MP, respectivamente). Desde el mes de agosto de 2012 los individuos capturados fueron sexados (siempre que fuera posible) a partir de la presencia del saco vocal desarrollado en machos. Se tomo como referencia al macho más pequeño con este carácter para distinguir a los machos adultos. En el caso de las hembras para lograr tal distinción se consideró la medida de la hembra más pequeña encontrada en un cuerpo de agua durante un evento de actividad reproductiva. Los individuos cuyas medidas estaban por debajo de estos valores de referencia fueron considerados juveniles. Una vez finalizada la toma de datos, cada individuo fue liberado en el mismo sitio de captura.

Procesamiento y análisis de datos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa PAST (PAleontological STatistics), versión 1.94 b y Statistica versión 6.1. En todos los casos para probar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos se utilizaron las pruebas de Levene y de Shapiro Wilk (SW), respectivamente. El nivel de significación se estableció a $\alpha=0,05$.

En el laboratorio, las fotografías fueron transferidas a una computadora para generar un banco de datos compuesto por imágenes de todos los eventos de captura anteriores. La comparación de las fotos y la identificación individual a partir de las marcas naturales se realizó utilizando el método de FI asistida por software (Caorsi *et al.*, 2012; Cairo *et al.*, 2013; Elgue *et al.*, 2013). El programa utilizado fue WILD ID (Bolger *et al.*, 2011), disponible en <http://www.dartmouth.edu/~envs/faculty/bolger.html>.

Una vez identificadas las recapturas (RC) por mes, se calculó su porcentaje a lo largo de todo el estudio y se efectuaron análisis de regresión lineal entre el número de capturas (C) y RC. Se determinó la razón de sexos en la población como el cociente entre

número de machos/número de hembras para comprobar si las variaciones en sus frecuencias absolutas siguen un patrón similar a lo largo del tiempo. Por otra parte, para estudiar la correlación entre la proporción de individuos activos por mes (número de individuos activos/número total de individuos encontrados) y las variables climáticas temperatura media (°C), precipitación total acumulada (mm) y humedad relativa media (%), se realizaron análisis de regresión lineal entre todas estas variables. Se consideraron las variables climáticas acotadas a los días de muestreo, incluyendo también los dos días previos.

Finalmente, para analizar los desplazamientos de los individuos dentro y entre los sitios de estudio, se identificaron los sitios de muestreo en imágenes de alta resolución. Utilizando el programa ArcGis 9.3 y los sitios digitalizados se determinó el centroide de cada uno de ellos (Fig. 3.1b) y para estimar la distancia que los separa se registró la medida en metros entre todos los centroides en línea recta (Tabla 3.1). También se tomó la medida en metros entre las zonas específicas donde fueron hallados los individuos dentro de cada sitio de muestreo. Para los animales que fueron recapturados más de una vez, solo se consideró el dato de mayor distancia recorrida en m por ese individuo en las sucesivas recapturas. Adicionalmente, para evaluar la correlación entre la Masa (g), LHC (mm) y el tiempo de RC de los individuos con la distancia recorrida en metros, se realizaron análisis de análisis de regresión entre estas variables. No fueron considerados los individuos que se encontraron en la misma zona específica del sitio de captura inicial (para estos animales se consideró distancia de recorrido igual a cero).





FIGURA 3.1. Imagen Satelital de la BLR tomada y modificada de Google Earth 2013. **a.** Los puntos verdes indican los cinco sitios de muestreo seleccionados. **b.** Los asteriscos negros representan los centroides de cada charco y las marcas rojas con letras indican zonas específicas de captura más relevantes dentro de cada sitio. **NOTA:** La imagen **b** esta ampliada, por lo cual, se cambia de posición el sitio C4 solo a modo ilustrativo.

TABLA 3.1. Distancias en metros entre los centroides de cada uno de los 5 sitios de muestreo seleccionados en la BLR.

Sitio		Distancia
Origen	Destino	Metros
C1	C2t	255,60
C1	C2c	344,28
C1	C3	499,19
C1	C4	1286,49
C2t	C2c	111,09
C2t	C3	247,11
C2t	C4	1029,32
C2c	C3	195,18
C2c	C4	946,81
C3	C4	777,40

RESULTADOS

Capturas y recapturas

A lo largo de los meses de muestreo fueron registrados cuatro eventos de actividad reproductiva para *Melanophryniscus montevidensis* en los meses de agosto, octubre y diciembre de 2012, y en febrero de 2013. Se obtuvieron en total 1867 capturas con un mínimo de 14 en el mes de setiembre de 2011 y un máximo de 373 en octubre de

2012 (Fig. 3.2). Se observaron dos picos de abundancia en las frecuencias absolutas de capturas que coinciden con meses de actividad reproductiva de la especie (agosto y octubre de 2012) (Fig. 3.2). Fueron sexados 1049 individuos. El macho más pequeño con saco vocal desarrollado midió 18,26 mm. Por otra parte, la hembra más pequeña encontrada en un charco durante un evento de actividad reproductiva como la más pequeña en amplexo midieron 21,82 y 21,83 mm respectivamente. Todos los individuos que superaron estas medidas de LHC fueron considerados adultos, obteniéndose en la muestra 731 machos y 318 hembras en esta clase de edad (Fig. 3.3a). Se encontraron 100 individuos juveniles (Fig. 3.3a). De este total ($n=100$), se asumió que los animales que superaron los 18,26 mm de LHC fueron hembras juveniles, mientras que el sexo de los individuos con tamaños inferiores no pudo ser determinado. La razón de sexos (RS) fue máxima durante el mes de febrero de 2013 ($RS=5,14$) y mínima en setiembre de 2012 ($RS=0,96$) (Fig. 3.4).

El software de fotoidentificación nos permitió reconocer en total 273 RC, a partir de la tercera salida de campo (noviembre 2011). El mínimo fue de un individuo recapturado en julio de 2012 y el máximo de 69 en octubre de 2012 (Fig. 3.2). Los picos en las frecuencias absolutas de individuos recapturados también coinciden con meses de actividad reproductiva, pero en este caso con octubre y diciembre de 2012 (Fig. 3.2). Analizando las RC, se puede distinguir que un solo individuo fue recapturado cuatro veces (Fig. 3.5), 26 fueron recapturados dos veces, y el resto una sola vez. El tiempo máximo transcurrido entre una captura y una recaptura fue de 14 meses y corresponde a dos machos capturados por primera vez en noviembre de 2011 y recapturados ambos en febrero de 2013. En cuanto a la proporción de sexos, fueron recapturados 152 machos y 61 hembras adultos (no fueron recapturados individuos juveniles) (Fig. 3.3b). Al igual que ocurrió en las capturas, la RS fue mínima en setiembre de 2012 ($RS=0,91$) y máxima en febrero de 2013 ($RS=7,25$) (Fig. 3.4). Finalmente, se halló una correlación positiva y significativa entre el número de capturas y el número de recapturas ($R^2=0,86$; $p<0,05$); encontrándose un claro incremento en el porcentaje de recapturas a medida que transcurren las salidas de campo.

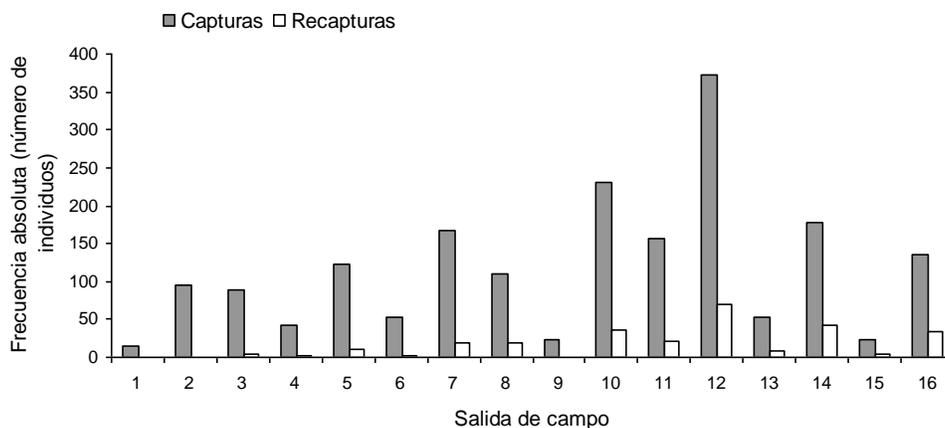
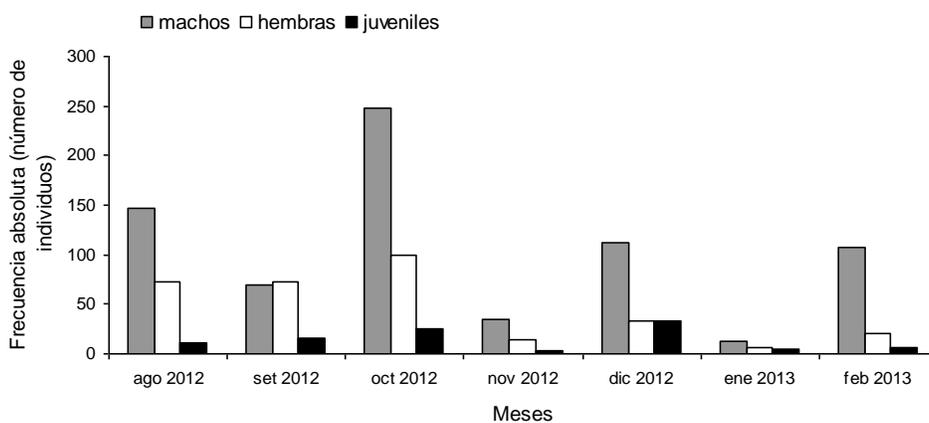


FIGURA 3.2. Variación mensual en la frecuencia absoluta de capturas y recapturas de individuos de *M. montevidensis* en la BLR durante el período de muestreo. **REFERENCIAS:** salidas de campo/meses: 1. set 2011; 2. nov 2011 (1); 3. nov 2011 (2); 4. feb 2012; 5. mar 2012; 6. abr 2012; 7. may 2012; 8. jun 2012; 9. jul 2012. 10. ago 2012; 11. set 2012; 12. oct 2012; 13. nov 2012; 14. dic 2012; 15. ene 2013; 16. feb 2013.

a.



b.

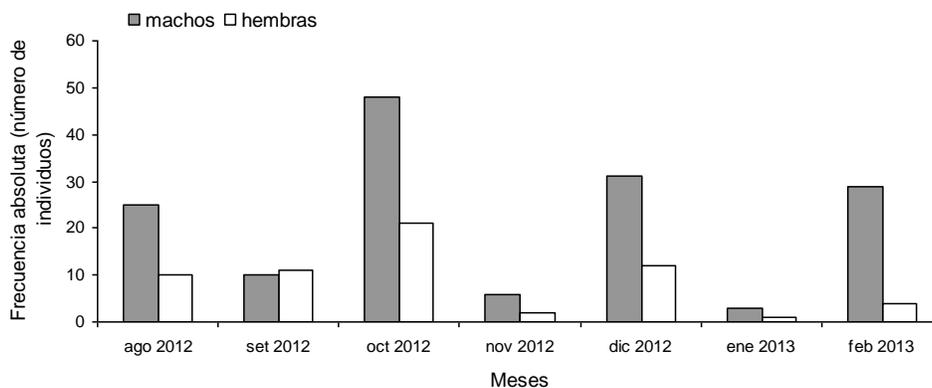


FIGURA 3.3. Variación mensual en la frecuencia absoluta de machos, hembras y juveniles de *M. montevidensis* en la BLR durante el período de estudio. **a.** Capturas. **b.** Recapturas

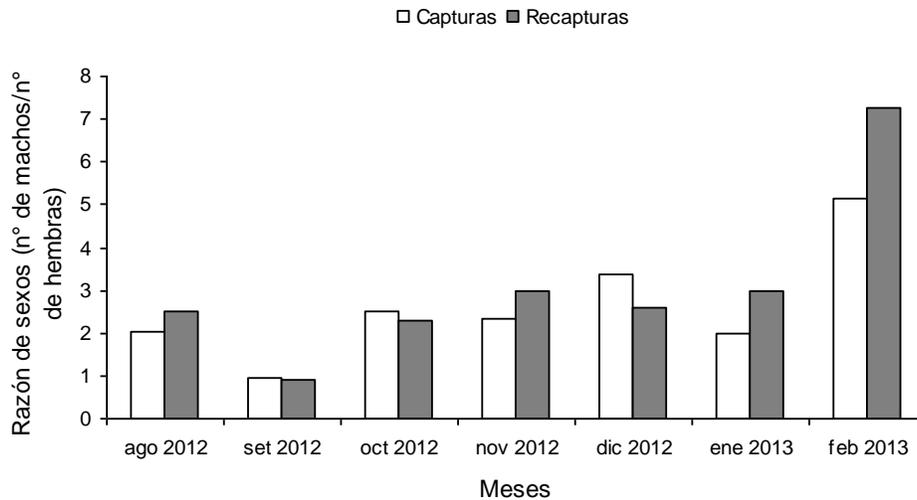


FIGURA 3.4. Variación mensual en la razón de sexos (n°machos/n°hembras) para una población de *M. montevidensis* de la BLR.

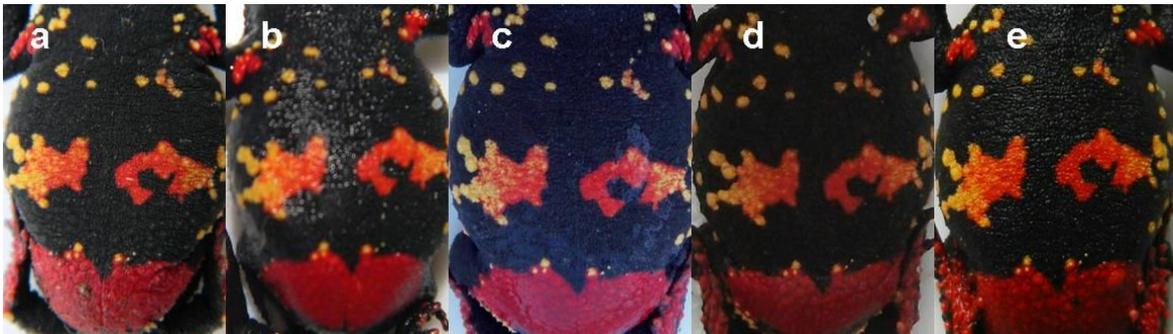


FIGURA 3.5. Ejemplar macho de *M. montevidensis* recapturado en cuatro oportunidades en la BLR durante el período de estudio. **REFERENCIAS:** a. Captura inicial: jul 2012, refugiado en C1; b. Recaptura 1: ago 2012, actividad reproductiva en C2t; c. RC 2: set 2012, activo en C2t; d. RC 3: oct 2012, actividad reproductiva en C2t; e. RC 4: dic 2012, actividad reproductiva en C2t.

Actividad de los individuos y relación con variables climáticas

A lo largo del año de estudio, la proporción de individuos activos de *M. montevidensis* fue máxima durante mayo, junio, agosto y octubre de 2012 y mínima en julio de 2012 (Fig. 3.6 y 3.7). En noviembre de 2012 y enero de 2013 no se encontraron individuos activos, todos estaban refugiados, principalmente debajo de juncos (Fig. 3.8a) y caraguatales y en cuevas en el piso (Fig. 3.8b). Fueron recapturados individuos utilizando el mismo refugio específico entre los meses. Adicionalmente, se encontró una correlación positiva y significativa entre la proporción de animales activos y la humedad relativa media (%) ($R^2=0,74$; $p<0,05$) (Fig. 3.9), pero no se encontró correlación con la temperatura

media (°C) ($R^2 < 0,01$; $p = 0,86$), ni con la precipitación total acumulada (mm) ($R^2 = 0,17$; $p = 0,18$).



FIGURA 3.6. Individuo de *M. montevidensis* activo durante el mes de diciembre de 2012 en C4.

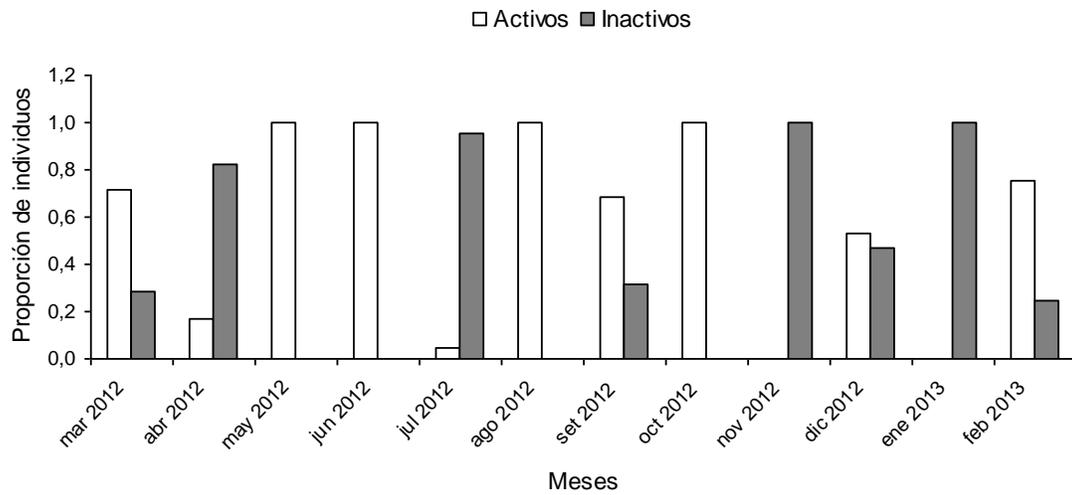


FIGURA 3.7. Variación mensual en la frecuencia relativa de individuos activos (número de individuos activos/número total de individuos encontrados) e inactivos (número de individuos inactivos/número total de individuos encontrados) para una población de *M. montevidensis* de la BLR.



FIGURA 3.8. Sitios de refugio de *M. montevidensis* en la BLR observados durante el período de estudio. **a)** Grupos de *Juncus sp.*, donde se refugiaban los individuos en C1. **NOTA:** las banderas violetas están indicando puntos de captura. **b)** Individuos refugiados en una cueva en el sitio C2c. FOTO b: Ignacio Lombardo.

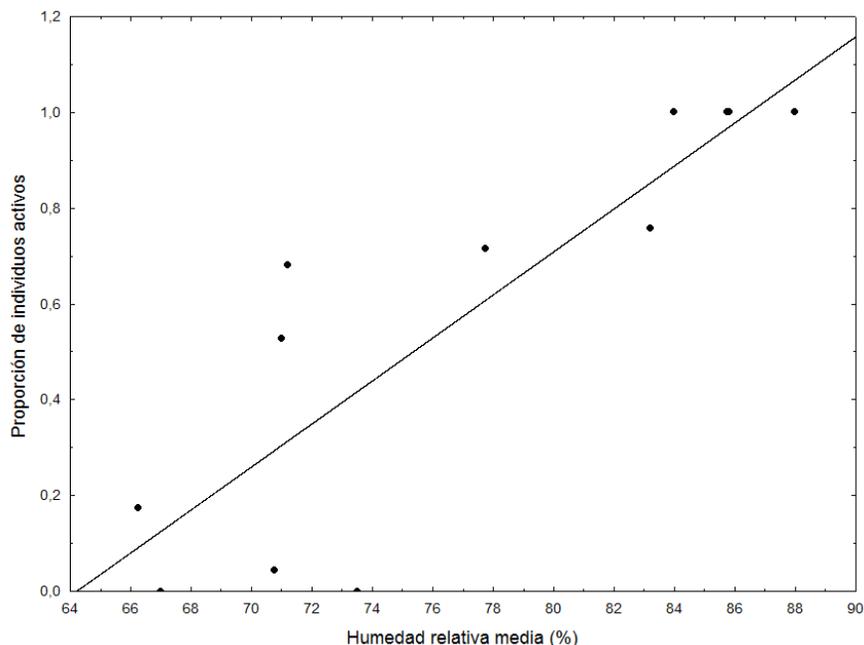


FIGURA 3.9. Modelo de regresión lineal entre la proporción de individuos activos de *M. montevicensis* (número de individuos activos/ número total de individuos encontrados) y la humedad relativa media (%).

Análisis de los movimientos

El 32,79% de los individuos recapturados ($n=244$), se halló en la misma zona específica del sitio de captura inicial (Fig. 3.10); el 48,36% se encontró en el mismo sitio pero en distinta zona específica y el restante 18,85% se movió a otro sitio distinto (Fig. 3.11a y 3.11b). Considerando a los individuos que se desplazaron dentro o entre sitios ($n=163$); la distancia máxima recorrida fue de 746 metros (m) (desde C4 a C3) y la mínima fue de 3,22 m (entre 2 zonas específicas de C4); siendo la media de 89,54 ($\pm 107,05$) m. El 71,78% de los individuos recorrió distancias menores a 100 m, el 26,38 % se desplazó entre 100-300 m y solo un 1,84% superó los 300 m (Fig. 3.12). No se encontró una correlación positiva y significativa entre la masa de los individuos y la distancia recorrida (m) ($R^2=0,02$; $p=0,07$); en cambio, la correlación entre LHC (mm) y la distancia (m), fue marginalmente significativa ($R^2=0,06$; $p<0,05$). Por otra parte, no se encontró asociación entre el tiempo de recaptura en meses y la distancia recorrida (m) ($R^2=0,01$; $p=0,12$).

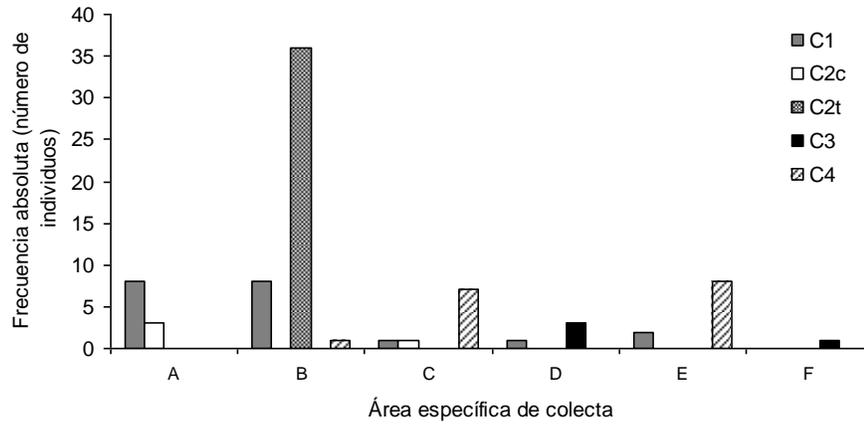


FIGURA 3.10. Distribución de los individuos de *M. montevideus* que se encontraron en los mismos puntos de captura inicial. Las letras en el eje de las x representan áreas específicas en cada uno de los 5 sitios de muestreo en la BLR.

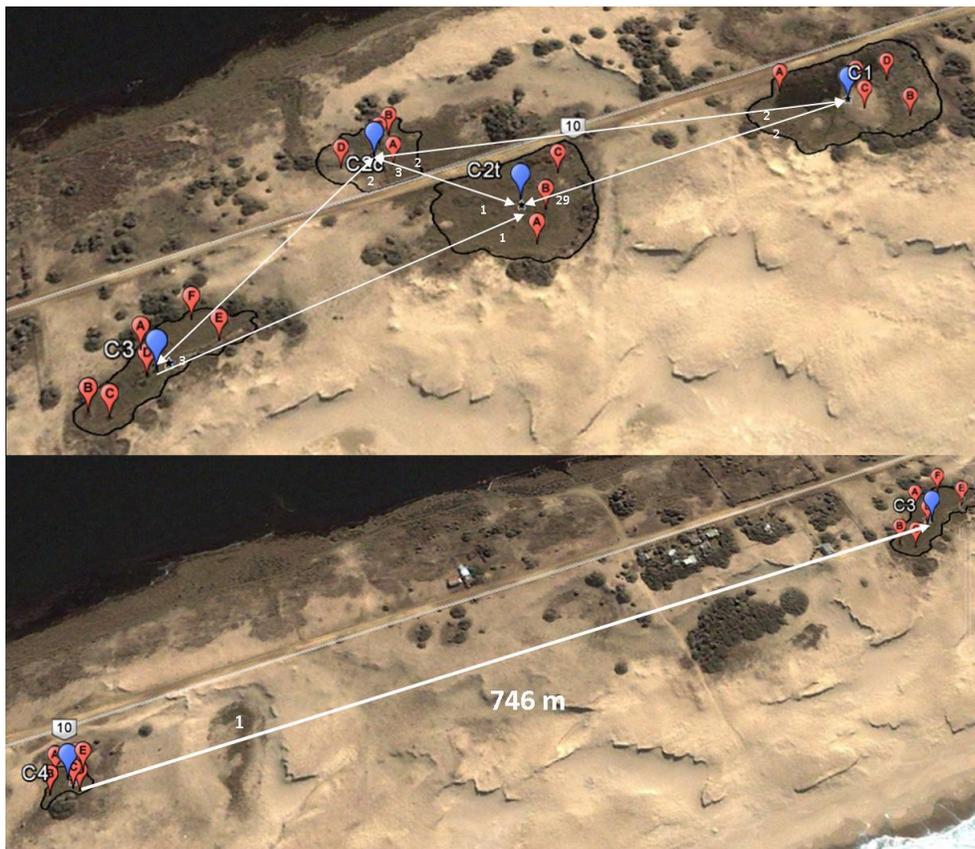


FIGURA 3.11. Representación de los desplazamientos de individuos de *M. montevideus* entre charcos en la BLR durante el período de estudio. **a.** Las flechas blancas indican el sentido de lo movimientos y los números debajo indican el número de individuos que realizaron ese recorrido. **b.** Distancia máxima recorrida por individuo de desde C4 hacia C3. Imagen Satelital tomada y modificada de Google Earth 2013.

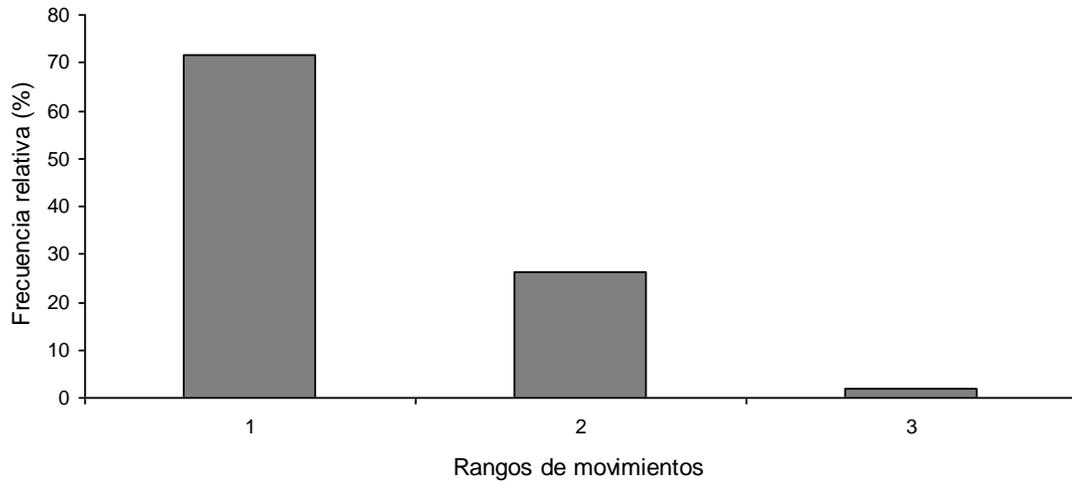


FIGURA 3.12. Distribución de frecuencias relativas de individuos de *M. montevidensis* en la BLR, entre los distintos rangos de movimientos observados: **1.** hasta 100 m; **2.** entre 100 y 300 m; **3.** más de 300 m.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos confirman la validez (Ver Anexo 3) del método de FI asistida por software para el reconocimiento individual en *M. montevidensis* a partir del patrón de coloración ventral único. Adicionalmente, resaltan la utilidad de esta herramienta en estudios de M-RC para analizar patrones de movimientos en anuros con variación fenotípica considerable, siendo su uso especialmente recomendable a la hora de trabajar con especies amenazadas, ya que es menos invasiva que los métodos tradicionales.

Capturas y recapturas

Los picos de abundancia en el número de individuos capturados y recapturados a lo largo del estudio, coinciden con períodos de actividad reproductiva de *M. montevidensis*. Esta observación es consistente con dos aspectos de la historia de vida de la especie. En primer lugar, con la dinámica de reproducción explosiva de la especie, donde los eventos reproductivos se encuentran asociados con fuertes precipitaciones (Maneyro & Carreira, 2012). Por otro lado, la estrecha ventana temporal en que los mismos tienen lugar (pocos días a pocas semanas), determina que los animales se muevan en forma masiva en dirección a los cuerpos de agua reproductivos (Wells, 1977). En

consecuencia, los individuos se vuelven más conspicuos y abundantes, durante este período, lo cual estaría explicando el mayor número de C y RC hallados en esos meses.

La variación mensual en la razón de sexos muestra que las frecuencias absolutas de machos y hembras no están sincronizadas en el tiempo, denotando un sesgo importante hacia un mayor número de machos. No obstante, se observó una tendencia a que en los meses en que no hubo reproducción la RS fue menor en comparación con los meses de actividad reproductiva, siendo cercana a uno en setiembre de 2012. El sesgo hacia un mayor número de machos de *M. montevidensis* podría deberse a que los sitios de muestreo incluyen los charcos temporales de reproducción y frecuentemente existe una fuerte selección de machos para llegar temprano a esos sitios, por lo tanto permanecer cerca de ellos les facilitaría el rápido retorno entre eventos reproductivos (Wells, 2007). Una explicación alternativa para entender la baja tasa de captura de hembras, estaría vinculada con su capacidad locomotora, ya que en muchas especies de anuros las hembras (generalmente más grandes) presentan mayor movilidad y son capaces de recorrer mayores distancias que los machos (Lemckert, 2004; Husté *et al.*, 2006). Por otra parte, no fueron recapturados individuos juveniles marcados (n=100). Esto podría deberse a que los anfibios recientemente metamorfoseados poseen una alta tasa de mortalidad, ya que a causa de su pequeño tamaño corporal son muy vulnerables a la desecación y a la depredación cerca de los charcos natales (Semlitsch, 2008; Walston & Mullin, 2008). Por otra parte, diversos estudios de campo han demostrado que los juveniles son más propensos a dispersarse a nuevos sitios (no natales) en relación con los adultos, constituyendo la etapa de dispersión en especies que se reproducen en charcos (Semlitsch, 2008). Alternativamente, los individuos juveniles podrían estar quietos unos meses, refugiados, esperando hasta alcanzar un tamaño óptimo para comenzar a moverse por el ambiente y reproducirse.

Actividad de los individuos y relación con variables climáticas

Los eventos reproductivos de *M. montevidensis* coincidieron con los cuatro períodos de máxima precipitación acumulada (superando los 60 mm en octubre, diciembre y febrero), en el área de estudio. Esto estaría confirmando la dependencia que

existe entre la actividad reproductiva de esta especie y las fuertes lluvias. El mismo patrón ya fue reportado para otras especies del género (Bustos Singer & Gutiérrez, 1997; Cairo *et al.* 2008). En cambio, encontramos que la actividad general de los individuos a lo largo del año (cuando los individuos se encontraron fuera de los refugios, moviéndose activamente por el ambiente) se correlacionó de manera positiva y significativa con el porcentaje de humedad relativa media, pero no con la precipitación total acumulada ni con la temperatura media. Esto es esperable para anfibios terrestres que, en general, no poseen adaptaciones morfológicas o fisiológicas para disminuir la pérdida de agua por evaporación y reducir el riesgo de desecación (Duellman & Trueb, 1994; Wells, 2007). Seebacher & Alford (1999) hallaron una relación similar entre los patrones de movimiento y los niveles de humedad relativa del ambiente en *Rhinella marina*. Estos autores, encontraron que la humedad del suelo también influye en los movimientos de *R. marina*, remarcando la importancia del consumo cutáneo de agua del suelo en esta especie. Este comportamiento fue reportado previamente en *Bufo bufo* (Jørgensen, 1994). La humedad del suelo no fue considerada en el presente estudio, por lo cual sería interesante incluir este parámetro en futuras investigaciones.

Durante el período de estudio, los individuos que no se encontraron activos, fueron observados ocupando refugios similares en los distintos sitios de monitoreo, principalmente debajo de caraguatales y juncos; y algunas veces en cuevas. Trabajos previos han mostrado que especies de anuros terrestres como los Dendrobátidos, Leptodactílidos y la mayoría de Bufónidos, generalmente utilizan refugios terrestres como agujeros de los árboles caídos, vegetación del suelo, grietas de las rocas y cuevas naturales o construidas (Tozetti & Toledo, 2005). La selección de los sitios de refugio se atribuye frecuentemente a la necesidad de protección frente a temperaturas extremas o deshidratación (Seebacher & Alford, 1999). Apoyando esta idea, en los monitoreos de noviembre de 2012 y enero de 2013, donde se registraron temperaturas medias elevadas, humedades relativas bajas y precipitaciones por debajo de los 2,1 mm, el 100% de los individuos encontrados en la zona de estudio estaban refugiados.

Análisis de los movimientos

Los métodos empleados para estimar patrones de movimientos de anfibios presentan ventajas y limitaciones. Por ejemplo, los carreteles de hilo son eficaces en el seguimiento continuo de individuos, pero están limitados a pequeños períodos, a distancias cortas (hasta 50 m) y a animales terrestres grandes (≥ 60 mm de longitud) (Sinsch, 1988; Heyer *et al.*, 1994). Por otra parte, el radiotracking (técnica más utilizada actualmente), permite el seguimiento a grandes distancias, pero no se puede seguir a muchos individuos, los transmisores son costosos y su peso ($<10\%$ de la masa total del animal) limita la duración de la batería y el período de rastreo (Wells, 2007; Iwai, 2013). El método utilizado en este trabajo (M-RC) es económico y además los individuos pueden ser rastreados durante largos períodos luego de ser exitosamente marcados (Iwai, 2013). Esta técnica ya se ha aplicado favorablemente en estudios de movimientos en bufónidos (Caldwell & Shepard, 2007). No obstante, hay que considerar que los resultados están condicionados por la tasa de RC, y el hecho de que los animales comúnmente desaparecen durante semanas o meses y luego vuelven a aparecer cerca del sitio de captura original (Wells, 2007). En consecuencia el movimiento aparente es pequeño, pero los movimientos realizados en el período intermedio no se conocen. En este sentido, Tozetti & Toledo (2005), observaron para *Leptodactylus labyrinthicus* que las mediciones de distancias lineales entre puntos en los sitios de captura/recaptura brindan valores subestimados cuando se comparan con las medidas obtenidas por carretel de seguimiento. Es muy importante tener en cuenta estas limitaciones a la hora de interpretar los resultados. En este trabajo asumimos que los movimientos son lineales y además que las distancias recorridas por un individuo en el intervalo entre eventos de C-RC son desconocidas, por lo cual, la distancia máxima recorrida registrada por animal debería ser considerada como el desplazamiento mínimo que puede efectuar el individuo en ese período.

A pesar de lo planteado anteriormente, se considera que la técnica de M-RC sería la más apropiada para el estudio de los patrones de movimiento de *M. montevidensis* en la BLR. Si bien no permite conocer con exactitud distancias recorridas por mes o día, proporciona una estimación valiosa de los patrones generales de movimiento de estos

individuos en su hábitat. El pequeño tamaño de este sapo y su estado de conservación avalarían la elección de la técnica de M-RC, ya que el efecto de otras técnicas de rastreo sobre el comportamiento de los anuros no están comprobados (Heyer, *et al.*, 1994). Apoyando la idea anterior, estudios recientes han demostrado la consistencia de los resultados obtenidos utilizando técnicas de radiotracking y M-RC en conjunto para determinar las áreas de distribución y los patrones de movimiento en *Babina subaspera* (Anura: Ranidae) una especie amenazada (Iwai, 2013).

La filopatría o fidelidad de sitio puede definirse como la predisposición de un animal de volver a una zona previamente ocupada o de permanecer en una misma área durante un largo período (Wells, 2007). Este comportamiento está bastante generalizado en anfibios que se reproducen en charcos (Smith & Green, 2005), los que pueden presentar fidelidad tanto al sitio reproductivo (Husté *et al.*, 2006) como a los refugios terrestres (aunque estos datos aún son preliminares) (Semlitsch, 2008). Este mismo autor sugiere que la filopatría y migración son impulsadas por las ganancias de *fitness* dentro de la población local cuando determinados hábitats siguen siendo favorables durante relativamente largos períodos y los costos de la dispersión (a causa de características fisiológicas de los anfibios) son altos. Por lo tanto, resulta ventajoso para los individuos volver a sitios conocidos que proporcionan alimentos, refugio, o parejas, en lugar de incurrir en el coste desconocido y potencialmente más caro que implica la localización de sitios alternativos (Seebacher & Alford, 1999).

Una alta fidelidad al sitio se ve reflejada en pequeños movimientos durante períodos prolongados (Caldwell & Shepard, 2007). En este trabajo se constató que no existe una correlación positiva y significativa entre la distancia en metros recorrida por individuo y el tiempo de RC, lo que estaría sugiriendo que los sapos no se encuentran en lugares más alejados en períodos más largos de recaptura. Por otro lado, más del 80% de los individuos fueron recapturados en el mismo sitio de captura inicial; mientras que la mayoría de los que se movieron dentro y entre sitios, se hallaron, con frecuencia, a menos de 100 m de su ubicación anterior. Solo tres animales se trasladaron 321, 366 y 746 m entre capturas sucesivas. Adicionalmente, los mismos individuos fueron recapturados utilizando el mismo lugar de refugio en distintos meses. Patrones similares se observaron

en estudios previos con ejemplares de *Rhinella ocellata* (que se encuentran a distancias < 1,5 m de su ubicación anterior, siendo éste el mayor movimiento hecho en un período de dos días; Caldwell & Shepard, 2007), así como de *Babina subaspera* (mayoritariamente recapturados a 200 m del punto de captura inicial, incluso en períodos mayores a 700 días) (Iwai, 2013) y *Epidalea calamita* (Husté *et al.*, 2006), entre otros. Considerando lo expuesto anteriormente, los resultados obtenidos en este trabajo estarían revelando un comportamiento de fidelidad de sitio en la población de *M. montevidensis* de la BLR.

Si bien la correlación existente entre la distancia recorrida en metros y el LHC de los individuos fue marginalmente significativa, no se podría descartar el efecto del tamaño en la capacidad de movimiento de *M. montevidensis*. Lemckert (2004) realizó una revisión de 10 estudios en bufónidos (siete especies en total) y encontró una correlación positiva significativa tanto en la distancia media y máxima de movimiento con el tamaño de los sapos, concluyendo que mayores tamaños corporales permiten movimientos más grandes en esta familia.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la FI a partir de marcas naturales es una herramienta muy útil en estudios de M-RC para analizar patrones de movimientos en *M. montevidensis*. Cabe destacar que las hipótesis 1 y 2 no pueden ser rechazadas, ya que la actividad de los individuos estuvo influenciada por la humedad relativa, y también se encontró una correlación entre el tamaño de los animales y la distancia recorrida. La hipótesis que plantea que el evento reproductivo condiciona la razón de sexos tampoco podría ser rechazada ya que además del sesgo esperado hacia un mayor número de machos, durante los meses de actividad reproductiva se observó una tendencia hacia una RS mayor. Adicionalmente la información obtenida estaría revelando un comportamiento de fidelidad de sitio en la especie. Estos datos son fundamentales para estimar efectos de la fragmentación del hábitat en poblaciones silvestres, ya que los individuos no serían capaces de cambiar su hábitat con facilidad. Un plan de monitoreo a largo plazo a partir de los resultados obtenidos en este trabajo sería recomendable para la

conservación exitosa de la población de *M. montevidensis* en el Paisaje Protegido Laguna de Rocha.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadie, M. 2012. Fotoidentificação como alternativa de marcação não invasiva para o sapinho microendêmico *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae). Trabajo de conclusión de curso, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Instituto De Biociências, Bacharelado Em Ciências Biológicas.
- Bailey, L. L. 2004. Evaluating elastomer marking and photo identification methods for terrestrial salamanders: marking effects and observer bias. *Herpetological Review*, 35:38-41.
- Beausoleil, N. J., Mellor, D. J. & Stafford, K. J. 2004. Methods for marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammals. Department of Conservation, Wellington, 147 pp.
- Bolger, D. T., Vance, B., Morrison, T. A. & Farid, H. 2011. Wild ID User Guide: Pattern Extraction and Matching Software for Computer-Assisted Photographic Mark-Recapture Analysis http://software.dartmouth.edu/Macintosh/Academic/Wild-ID_1.0.0.zip.
- Bradfield, K. S. 2004. Photographic identification of individual Archey's Frogs, *Leiopelma archeyi*, from natural markings. DOC Science Internal Series, 191:1-36.
- Bustos Singer, R. & Gutiérrez, M. 1997. Reproducción y desarrollo larval del sapo enano: *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenbergh, 1875) (Anura: Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología*, 11: 21-30.
- Cairo, S. L., Zalba, S.M. & Úbeda, C. A. 2013. Reproductive pattern in the southernmost populations of South American redbelly toads. *Journal of Natural History*, 47: 2125-2134.
- Cairo, S. L., Maldonado, M. A., Zalba, S. M. & Úbeda, C. A. 2008. Conservación de *Melanophryniscus sp.* (sapito panza roja) en Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). En: *Ambientes y recursos naturales del Sudoeste Bonaerense: producción, contaminación y conservación (Actas de las V Jornadas*

- Interdisciplinarias del Sudoeste Bonaerense*), 445-455. Cazzaniga, N.J. & Arelovich, H.M (Eds.). EdiUNS: Bahía Blanca, Argentina.
- Caldwell, J. P. & Shepard, D.B. 2007. Calling site fidelity and call structure of a neotropical toad, *Rhinella ocellata* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 41: 611-621.
- Caorsi, V. Z., Santos, R. R. & Grant, T. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South American Journal of Herpetology*, 72:79-84.
- Del Lama, F., Dumond Rocha, M., Andrade, M. A. & Barreto Nascimento, L. 2011. The use of photography to identify individual tree frogs by their natural marks. *South American Journal of Herpetology*, 6: 198-2004.
- DINAMA. 2010. Plan de mediano plazo 2010/2014. (Hemisferio Sur, Ed.) (1st ed., p. 118). Montevideo, Uruguay.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore e London.
- Elgue, E., Cruces, S., Pereira, G. Achaval-Coppes, F. & Maneyro, R. 2013. Validez de la fotoidentificación utilizando marcas naturales en *Melanophryniscus montevidensis*. En: Libro de Resúmenes XIV Congreso Argentino de Herpetología; p42.
- Ferner, J. W. 2007. A Review of Marking and Individual Recognition Techniques for Amphibians and Reptiles. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Salt Lake City, 72 pp.
- Guimarães, T. C. S., de Figueiredo, G. B., Mesquita, D. O. & Vasconcellos, M. M. 2011. Ecology of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a Neotropical Savanna. *Journal of Herpetology*, 45:244-250.
- Heyer, W. R., Donnelly, M. A., McDiarmid, R. W., Hayek, L. A. C. & Foster, M. S. 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington DC. 364 pp.
- Husté, A., Clobert, J. & Miaud, C. 2006. The movements and breeding site fidelity of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in an urban park near Paris (France) with management recommendations. *Amphibia-Reptilia*, 27: 561-568.

- Iwai, N. 2013. Home Range and movement patterns of the otton frog: integration of year-round radiotelemetry and mark–recapture methods. *Herpetological Conservation and Biology*, 8:366–375.
- Jørgensen, C. B. 1994. Water economy in a terrestrial toad (*Bufo bufo*), with special reference to cutaneous drinking and urinary bladder function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109:311-324.
- Langone, J. 2004. *Melanophryniscus montevidensis*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.1. Disponible en: www.iucnredlist.org. Último acceso: 24 de enero de 2014.
- Lemckert, F. L. 2004. Variations in anuran movements and habitat use: implications for conservation. *Applied Herpetology*, 1:165-181.
- Maneyro, R. & Carreira, S. 2012. Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la fuga, Montevideo.
- Miranda, T., Ebner, M., Solé, M. & Kwet, A. 2005. Estimativa populacional de *Pseudis cardosoi* com emprego método fotográfica para reconhecimento individual. *Biociências*, 13: 49-54.
- Ribeiro, J. & Rebelo, R. 2011. Survival of *Alytes cisternasii* tadpoles in stream pools: a capture-recapture study using photo-identification. *Amphibia-Reptilia*, 32: 365-374.
- Sacchi, R., Scali, S., Pellitteri-Rosa, D., Pupin, F., Gentilli, A., Tettamanti, S., Cavigioli, L., Racina, L., Maiocchi, V., Galeotti, P., & Fasola, M. 2010. Photographic identification in reptiles: a matter of scales. *Amphibia-Reptilia*, 31: 489-502.
- Santos, R. R. & Grant, T. 2011. Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evolutionary Ecology*, 25: 249-258.
- Seebacher, F. & Alford, R. A. 1999. Movement and Microhabitat Use of a Terrestrial Amphibian (*Bufo marinus*) on a Tropical Island: Seasonal Variation and Environmental Correlates. *Journal of Herpetology*, 33: 208-214.
- Semlitsch, R. D. 2008. Differentiating Migration and Dispersal Processes for Pond-Breeding Amphibians. *The Journal of Wildlife Management* 72, 260-267.

- Sinsch, U. 1988. Seasonal changes in the migratory behavior of the toad *Bufo bufo*, direction and magnitude of movements. *Oecologia*, 76:390-398.
- Sluys, M. V. & Guido-Castro, P. 2011. Influence of Temperature and Photoperiod on the Activity of *Melanophryniscus moreirae* (Miranda-Ribeiro 1920) (Anura: Bufonidae) on the Itatiaia Plateau , Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6: 43-48.
- Smith, M. A. & Green, D.M. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, 28: 110-128.
- Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., and Young, B. E. 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; and Conservation International, Arlington, Virginia, USA.
- Tozetti, A. M. & Toledo, L. F. 2005. Short-term movement and retreat sites of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) during the breeding season: a spool-and-line tracking study. *Journal of Herpetology*, 39: 640-644.
- Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. 2009. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Third Edition. Academic Press, Burlington, Massachusetts.
- Walston, L. J. & Mullin, S. J. 2008. Variation in amount of surrounding forest habitat influences the initial orientation of juvenile amphibians emigrating from breeding ponds. *Canadian Journal of Zoology*, 86: 141-146.
- Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25: 666-693.
- Wells, K. D. 2007. The ecology & behavior of amphibians. Chicago (IL): University of Chicago Press.
- Wells, K. D. & Wells, R. A. 1976. Patterns of movement in a population of the slimy salamander, *Plethodon glutinosus*, with observations on aggregations. *Herpetologica*, 32: 156-162.
- Yu, T., Guo, Y. & Lu, X. 2010. Habitat selection of Asiatic toad, *Bufo gargarizans* (Cantor, 1842), in southwestern China. *Russian Journal of Ecology*, 41: 192-196.

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 1: “Patrones de actividad reproductiva en una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae)”.

- *Melanophryniscus montevidensis* presenta un patrón de reproducción explosivo, con eventos reproductivos no estacionales que ocurren a intervalos variables a lo largo del año. No se puede rechazar la hipótesis de que las precipitaciones favorecen la actividad reproductiva en la especie ya que la reproducción se encontró asociada con la precipitación total acumulada.
- La actividad de vocalización de los machos se extendió hasta altas horas de la noche y también fueron vistas parejas en amplexo en el mismo horario, por lo que se debe reconsiderar si la especie es exclusivamente diurna.
- La segunda hipótesis propuesta tampoco puede ser rechazada, ya que las hembras fueron más grandes y pesadas que los machos y estos superaron cuantitativamente a las hembras en todos los eventos reproductivos. En consecuencia tuvieron que recurrir a estrategias comportamentales alternativas para obtener pareja como por ejemplo la búsqueda activa de hembras.
- La última hipótesis propuesta tampoco puede ser rechazada a causa de que no se encontró asociación entre el tamaño de la hembra con la fecundidad, ni con el tamaño del huevo.

CAPÍTULO 2: “Uso del microhábitat reproductivo en una población de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay”.

- En la Barra de la Laguna de Rocha, *M. montevidensis* utiliza como sitios reproductivos cuerpos de agua temporales de tamaños variables, con sustratos arenosos y poco profundos.

- La vegetación hidrófila fue la más representativa y muy abundante tanto dentro como fuera del charco y fue utilizada tanto para sujeción durante la vocalización y el amplexo, como para el soporte de los huevos.
- No se puede rechazar la hipótesis propuesta ya que los individuos en actividad reproductiva prefieren las zonas cercanas al borde del charco con vegetación más densa.
- Los machos vocalizadores ocuparon posiciones más cercanas al borde del charco y además presentaron un mejor estado energético en relación con los no vocalizadores.
- Además de la vocalización como estrategia para atraer a las hembras coespecíficas, los machos utilizaron tácticas alternativas como la búsqueda activa de hembras y comportamientos agresivos como el de macho desplazador. También fueron observadas interacciones físicas entre machos.
- Los cuerpos de agua utilizados por *M. montevidensis* en la BLR serían sitios apropiados para su reproducción y posterior desarrollo larval.

CAPÍTULO 3: “Análisis de los movimientos en una población uruguaya de *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) utilizando la fotoidentificación para el reconocimiento individual”.

- La Fotoidentificación a partir de marcas naturales es una herramienta muy útil en estudios de marcaje y recaptura (M-RC) para analizar patrones de movimientos en *M. montevidensis*.
- La técnica de M-RC, sería la más apropiada para el estudio de los patrones de movimiento de la especie.
- No se puede rechazar la primera hipótesis de trabajo propuesta que planteaba que el desplazamiento en *M. montevidensis* está condicionado por el tamaño corporal, ya que se encontró una débil pero significativa correlación entre el tamaño de los animales y la distancia recorrida.

- Tampoco se puede rechazar la segunda hipótesis propuesta, debido a que la actividad estuvo influenciada por la humedad relativa.
- La hipótesis que plantea que el evento reproductivo condiciona la razón de sexos tampoco podría ser rechazada ya que además del sesgo esperado hacia un mayor número de machos, durante los meses de actividad reproductiva se observó una tendencia hacia una mayor razón de sexos.
- Los resultados obtenidos estarían revelando un comportamiento de fidelidad de sitio en la especie.

PERSPECTIVAS

En Uruguay *M. montevidensis* es una especie prioritaria para la conservación, según los criterios 1, 2, 4, 5, 6 y 7 del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (1) y actualmente está incluida en tres de sus áreas. No obstante, la sola inclusión dentro del área protegida no asegura su conservación, sino que se requiere de la aplicación de medidas específicas para lograr una estabilidad poblacional. En este sentido, en el Paisaje Protegido Laguna de Rocha, donde se desarrolló el presente estudio, no está definido aún un plan de manejo que contemple medidas específicas para la población de *M. montevidensis*. La falta de información acerca de la biología de las especies es una de las principales limitantes a la hora de proponer planes de conservación *in situ* adecuados. En este contexto, la información vinculada con la historia natural de la especie obtenida a partir de esta investigación, es sumamente valiosa y sería recomendable su consideración asumiendo que se necesitan medidas de manejo para la población en el área. Cabe destacar que esta información generada podría servir como punto de partida para establecer un plan de monitoreo a futuro de la población. Adicionalmente, para lograr un seguimiento exitoso, sería necesario realizar estudios complementarios que permitan conocer la demografía actual de la población como el tamaño poblacional, tasas de natalidad, mortalidad, supervivencia, estructura por edades, etc. También sería sumamente relevante realizar estudios genéticos y moleculares para determinar el grado de variabilidad genética de las poblaciones relictuales, el flujo actual entre estas poblaciones y el efecto del aislamiento sobre el mismo. Esto sería muy importante considerando que la fragmentación del hábitat es una de las principales causas propuestas para explicar la declinación de las poblaciones silvestres. El monitoreo a largo plazo permitiría distinguir con precisión entre las fluctuaciones naturales de la población y la disminución real que pueda experimentar.

(1) Soutullo A., Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J. A. (eds.). 2013. Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/ MEC, Montevideo. 222 pp.

ANEXO 1. La zona de estudio

La costa atlántica uruguaya comprende un sistema lacustre costero integrado por las lagunas del Sauce, José Ignacio, Garzón, Rocha, Nutrias, Castillos, Negra y Merín (ubicada en la frontera entre Uruguay y Brasil) (Bonilla *et al.*, 2006) (Figura 1). Son cuerpos de agua someros, de poca profundidad y de formación geológica reciente. Algunas de estas lagunas tienen conexión directa al océano a través de un sistema dinámico de apertura y cierre de sus barras arenosas (IMR & PROBIDES, 2002). Considerando la frecuencia de conexión se pueden diferenciar, las que permanecen siempre aisladas (Ej. Laguna del Sauce, Negra) y otras con conexión intermitente (Ej. Laguna de Rocha, Garzón, José Ignacio y Castillos) (Bonilla *et al.*, 2006). Dicha conexión permite que confluyan dos flujos de energía que están en constante cambio; el agua que proviene del continente y el océano. En consecuencia, las lagunas costeras presentan cambios muy dinámicos a nivel espacio-temporal y en sus características físicas y químicas, especialmente la salinidad (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). Dependiendo de la relación del sistema con el océano, las comunidades biológicas pueden estar representadas alternativamente por especies límnicas, eurihalinas o marinas (Bonilla *et al.*, 2006).

Las lagunas costeras son ecosistemas muy productivos, poseen alta diversidad florística y son relevantes para la conservación de la biodiversidad ya que son refugio de aves migratorias y de la biota acuática (Aubriot *et al.*, 2005). Sus cuencas cumplen un rol hidrológico relevante ya que recolectan agua en las sierras y la distribuyen a través de un complejo sistema de cursos de agua y humedales, recargando acuíferos, abasteciendo de agua durante sequías, atenuando inundaciones durante las épocas lluviosas y manteniendo el funcionamiento de diversos ecosistemas (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). Adicionalmente, sustentan la pesca artesanal y una importante producción agropecuaria, los cual les confiere un alto valor económico además de ecológico (IMR & PROBIDES, 2002; Aubriot *et al.*, 2005). En estos ambientes, el frágil equilibrio entre la biota y el medio físico es muy vulnerable a las actividades humanas como la eutrofización (Bonilla *et al.*, 2006). Por todo lo expuesto anteriormente, las lagunas y los humedales asociados están recibiendo a nivel nacional e internacional mayor apoyo para su conservación. En 1976 el Programa MAB de la UNESCO declaró Reserva de Biosfera a los humedales del sureste de

Uruguay bajo el nombre “Reserva de Biosfera Bañados del Este”. El área incluye los bañados, esteros y lagunas paralelos a la costa atlántica (Figura 1); posee una alta biodiversidad (particularmente en la avifauna) y se destaca como sitio importante para aves migratorias siendo reconocido como sitio RAMSAR en 1984 (Pezzani, 2007). Adicionalmente, varias de las lagunas costeras fueron declaradas Áreas Naturales Protegidas por decretos y leyes nacionales (Reserva de Fauna Laguna de Castillos - Decreto 266/66 y Parque Nacional Lacustre y Área de Uso Múltiple Lagunas de Rocha, J. Ignacio y Garzón - Decreto 260/77) y en la actualidad algunas están incluidas en el nuevo Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP; Ley 17.234 de 2000).

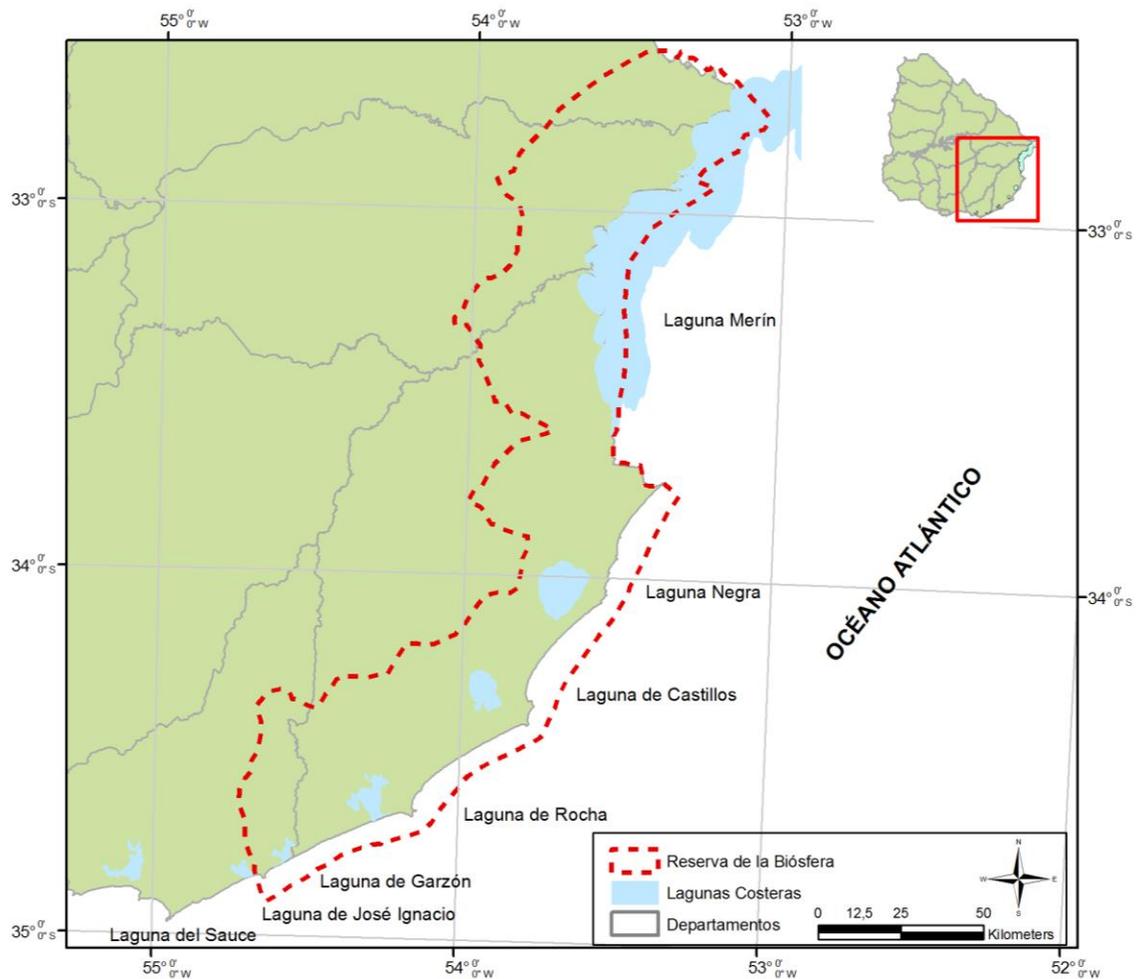


FIGURA 1. Lagunas costeras de Uruguay.

El paisaje protegido **Laguna de Rocha (LR)** del SNAP (DINAMA, 2010), se encuentra sobre la costa Atlántica del departamento de Rocha, Uruguay (34°35' S; 54°17' W) (Figura 2 y 3). La Laguna posee un área de 72 km² con una profundidad media de 0,6 m y una máxima de 1,4 m. Esta se comunica periódicamente con el océano Atlántico (1-5 veces al año) a través de la apertura y cierre de la barra arenosa (MVOTMA, 2014) (Figura 2 y 4). Esta apertura puede ser natural por la acumulación de agua dulce dentro del sistema, o artificial cuando la cota alcanza valores máximos. El cierre de la misma se produce mediante la acumulación de arena por acción del transporte marino (Aubriot *et al.*, 2005). La dinámica de apertura y cierre de la barra genera un intercambio de agua dulce y salada, nutrientes y organismos vivos, incluidas especies de alto valor pesquero y gastronómico (Bonilla *et al.*, 2006). A su vez, esta mezcla de aguas produce un fuerte gradiente de salinidad (desde el S al N) que condiciona las características físico-químicas del sistema así como a las comunidades que allí se desarrollan (Aubriot *et al.*, 2005). Su baja profundidad y la mezcla de aguas marinas y continentales favorecen el desarrollo de una gran biodiversidad.

La cuenca de la LR posee un área de 121433 ha y se extiende desde la Sierra de Rocha y de Carapé hacia la zona de la barra arenosa. La cobertura del suelo se clasificó en: bosque nativo, forestación, agricultura, dunas o arenales, espejo de agua de la LR y Laguna de las Nutrias, humedal de plantas emergentes y pradera inundable. Lo que quedó fuera de esta clasificación se consideró “campo” (praderas naturales, chircales, pajonales, rastrojos antiguos y praderas mejoradas o artificiales antiguas) (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). El paisaje natural en general estuvo poco alterado hasta que comenzó el desarrollo forestal y la intensificación de usos agrícolas, la actividad industrial es muy escasa y predomina la ganadería extensiva (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). A pesar de considerarse un ecosistema escasamente impactado, entre las principales problemáticas actuales se destaca el proceso reciente de eutrofización y los registros de floraciones de cianobacterias producido probablemente por recientes cambios en el uso de la tierra y el mayor aporte de las aguas de desecho de las ciudades (Aubriot *et al.*, 2005). Además, se distinguen otros impactos ambientales como la intensa explotación de peces y carpinchos

(entre otros), urbanización descontrolada y contaminación entre otras cosas (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008).

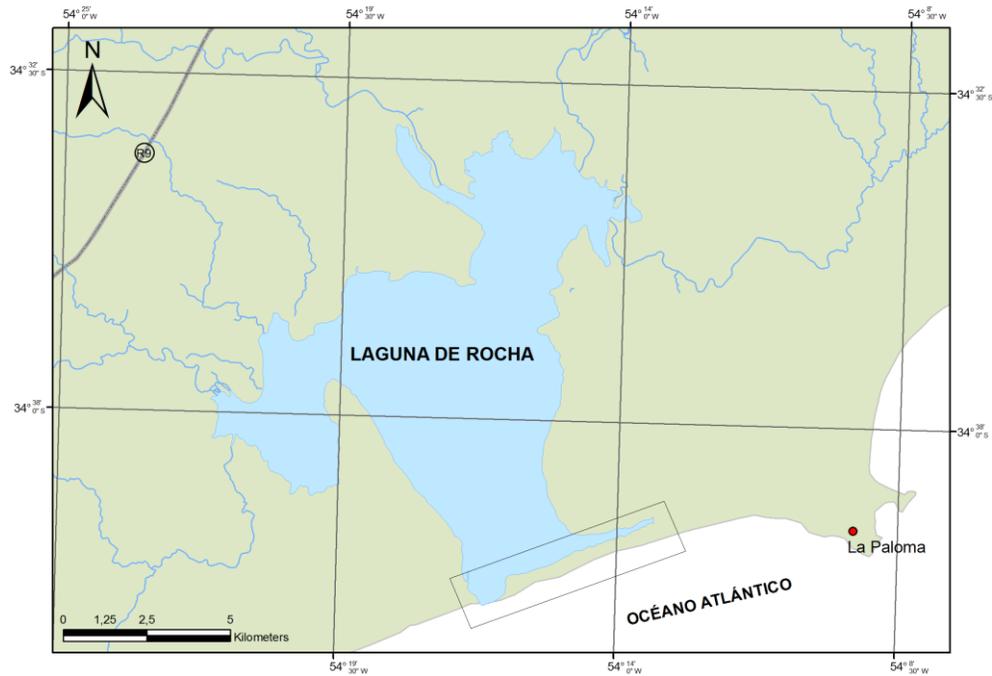


FIGURA 2. Laguna de Rocha. El rectángulo gris está marcando la zona de la Barra de la Laguna de Rocha.



FIGURA 3. Laguna de Rocha. Foto: Fundación Amigos de las Lagunas Costeras. Disponible en: <http://www.amigosdelaslagunasderocha.org/fotos.php>

En el entorno de la LR, la alta concentración de sales en el ambiente determina una cobertura vegetal psamófila. En las cercanías de la playa se desarrollan dunas y médanos con especies pioneras como pasto dibujante, redondita de agua y margarita amarilla y en las depresiones dunares (mayor disponibilidad de agua) el junco de copo y campanilla (MVOTMA, 2014). En la costa Oeste existe un bañado salino o cangrejal y en la planicie de inundación donde se ubica la laguna de las Nutrias (pequeña laguna de agua dulce asociada a la desembocadura de la LR) hay juncales (IMR & PROBIDES, 2002). En la zona más alta se desarrolla un bosque nativo costero compuesto por coronilla, tala, canelón, chal chal, molle, palo de fierro, espina amarilla, congrosa, cereus, chumbera y arrayán (IMR & PROBIDES, 2002). El matorral psamófilo que normalmente se desarrolla entre el bosque y la vegetación de dunas costeras, esta representado sólo por pequeños y escasos parches de espina de la cruz, tunas, efedra y cardilla. También pueden encontrarse en la zona pajonales extensos y espartillares (IMR & PROBIDES, 2002).

En relación a la fauna, la LR se destaca como la zona de la costa uruguaya más rica en especies de aves residentes y migratorias, ya que proporciona sitios de descanso y nidificación para estos animales (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). Las aves costeras migratorias aparecen durante todo el año a través de distintas corrientes migratorias y permanecen por 3 o 4 meses (RHRAP, 2013). Se destacan en esta zona las mayores concentraciones de *Cygnus melancoryphus* (cisne de cuello negro) y de *Coscoroba coscoroba* (coscoroba). Adicionalmente, se localizan especies amenazadas a nivel mundial como *Phoenicopterus chilensis* (flamenco austral), *Larus atlanticus* (gaviota cangrejera), *Tryngites subruficollis* (chorlito canela) y *Xolmis dominicanus* (viudita blanca grande) (Aldabe *et al.*, 2006). Se encuentran también *Sternula superciliaris* (gaviotín chico) y grandes congregaciones de gaviotines (Laridae) y aves limícolas (Charadriidae y Scolopacidae) (Aldabe *et al.*, 2006). La LR fue designada como reserva de la RHRAP en Uruguay por tener más del 6% de la población global de *T. subruficollis* (RHRAP, 2013). Por otra parte, en la costa existen abundantes invertebrados de arena (por ejemplo tatucitos y anfípodos) que constituyen la base de la trama trófica costera, sirviendo como alimento para peces y aves (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008).

La fauna ictícola es importante y aumenta por la apertura de la barra arenosa. Una de las actividades más destacadas es la cría y alimentación de especies de peces y crustáceos costeros de interés comercial. Las principales especies de peces son: *Brevoortia aurea* (lacha), *Rhamdia quelen* (bagre negro), *Mugil* spp. (lisa), *Micropogonias furnieri* (corvina blanca) y *Paralichthys orbignyana* (lenguado), entre otras (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). Entre los invertebrados se registra la presencia de camarón, cangrejo azul y berberecho de laguna (IMR & PROBIDES, 2002). Los anfibios pueden encontrarse en la zona del borde costero, en médanos con vegetación, en cuerpos de agua someros, o en bañados con gramíneas y juncos (IMR & PROBIDES, 2002). Algunas de las especies presentes en el área son: *Rhinella arenarum* (sapo común), *Melanophryniscus montevidensis* (Sapito de Darwin), *Odontophrynus americanus* (Escuerzo chico), *Leptodactylus latrans* (Rana común), *Physalaemus biligonigerus* (Ranita de cuatro ojos), *Pseudis minuta* (Rana boyadora grande), *Pseudopaludicola falcipes* (Macaquito), *Hipsiboas pulchellus* (Ranita trepadora) y *Scinax squalirostris* (Ranita hocicuda), entre otras (IMR & PROBIDES, 2002). Entre los reptiles (menos representados), podemos encontrar: *Hydromedusa tectifera* (tortuga cabeza de víbora), *Acanthochelys spixii* (tortuga de canaleta), *Liolaemus wiegmannii* (lagartija de la arena de Wiegmann), *Bothrops alternatus* (crucera) y culebras (por ej: falsa coral, parejera, de peñarol, de líneas amarillas). Durante eventos de apertura de la barra, también han ingresado tortugas marinas como *Chelonia mydas* (tortuga verde) (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008).

En relación a los mamíferos, en el área se encuentran los registros más australes de *Mazama gouazoubira* (ciervo guazubirá) y *Procyon cancrivorus* (mano pelada). También se han observado especies como *Leopardus geoffroyi* (gato montés), *Leopardus braccatus* (gato de pajonal), *Leopardus wiedii* (margay); *Dasypus hybridus* (mulita) y zorros (IMR & PROBIDES, 2002). La Laguna de la Nutrias presenta importantes poblaciones de carpinchos, nutrias y lobitos de río (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). La zona marina incluida dentro del Área protegida LR (se extiende 5 millas náuticas en el Océano Atlántico, hasta una profundidad menor a los 30 m), es relevante para la traslación de cetáceos como *Eubalaena Australis* (ballena franca) y *Pontoporia blainvillei* (delfín

franciscana) (MVOTMA, 2014). En este sentido, entre el año 2001 y 2003 se ha registrado el mayor número de avistamientos de la Ballena franca (Piedra *et al.*, 2006).

La Barra de la Laguna de Rocha (34° 40' 02" Sur, 54° 14' 00" Oeste) (Figura 3), es la zona más crítica del toda el área protegida ya que es donde se genera la conexión entre la laguna y el mar, por donde ingresan larvas de peces y crustáceos que se desarrollan en la laguna y por donde salen los adultos que se dirigen a reproducirse en el mar (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2008). Adicionalmente, es un sitio importante como descanso de aves migratorias (durante todo el año) y residentes, posee un gran atractivo turístico y sus arenales son hábitats importantes para anfibios y reptiles, donde se destaca *Melanophryniscus montevidensis* una especie amenazada a nivel local y global (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2011). Por todo lo expuesto anteriormente, esta zona requiere medidas de conservación estrictas. En este sentido, los pescadores artesanales de la laguna propusieron una zona de exclusión de pesca en la barra, la cual DINARA reglamentó con algunas modificaciones.



FIGURA 4. Barra de la Laguna de Rocha. Foto: Fundación Amigos de las Lagunas Costeras. Disponible en: <http://www.amigosdelaslagunasderocha.org/fotos.php>

BIBLIOGRAFÍA

- Aldabe, J., Jiménez, S. & Lenzi, J. 2006. Aves de la costa sur y este uruguay: composición de especies en los distintos ambientes y su estado de conservación. En: Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D. (Eds.). *Bases para la Conservación y el Manejo de la Costa Uruguaya* (pp. 271-287). Vida Silvestre Uruguay, GRAPHIS Ltda., Montevideo.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S., Hein, V. & Britos, A. 2005. Vulnerabilidad de una laguna costera en una Reserva de Biosfera: indicios recientes de eutrofización. En: Vila, I. & Pizarro, J. (Eds.). *Taller Internacional de Eutrofización de Lagos y Embalses* (pp 65-85). CYTED XVIIIB. Patagonia Impresores, Chile.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Rodríguez-Gallego, L., Piccini, C., Meerhoff, E., Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Gómez, P., Machado, I. & Britos, A. 2006. Procesos estructuradores de las comunidades biológicas en lagunas costeras de Uruguay. En: Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D. (Eds.). *Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya* (pp. 611-630). Vida Silvestre Uruguay, GRAPHIS Ltda., Montevideo.
- DINAMA. 2010b. *Plan de mediano plazo 2010/2014*. (Hemisferio Sur, Ed.) (1st ed., p. 118). Montevideo, Uruguay.
- IMR & PROBIDES. 2002. Proyecto de Desarrollo de las Áreas Protegidas Laguna de Garzón y Rocha. *Bases para un Plan de Manejo*. Documentos de trabajo N° 44, PNUD, Rocha, Uruguay.
- Pezzani, F. 2007. Reserva de Biosfera Bañados del Este, Uruguay. Documentos de Trabajo N° 37, UNESCO (Programa de Cooperación Sur-Sur), París, Francia.
- Piedra, M., Costa, P., Franco Fraguas, P. & Álvarez, R. 2006. Ballena franca (*Eubalaena australis*) en la costa atlántica uruguaya. En: Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D. (Eds.). *Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya* (pp. 585-590). Vida Silvestre Uruguay, GRAPHIS Ltda., Montevideo.
- RHRAP. 2013. Laguna de Rocha. Red hemisférica de reservas para aves playeras. Disponible en: www.whsrn.org. Último acceso: 6 de enero de 2014.

- Rodríguez-Gallego, L., Nin, M. & Conde, D. 2011. Descripción del funcionamiento ecosistémico de la Laguna de Rocha. Consultoría técnica para apoyar el proceso de elaboración del plan de manejo del Paisaje Protegido Laguna de Rocha. Pp75-85.
- Rodríguez-Gallego, L., Santos, C., Amado, S., Gorfinkel, D., González, M.N., Gómez, J, Neme, C., Tommasino, H. & Conde, D. 2008. Costos y beneficios socioeconómicos y ambientales del uso actual de la Laguna de Rocha y su cuenca: insumos para la gestión integrada de un área protegida costera. Informe final Proyecto PDT 36-09. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- MVOTMA. 2014. Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Paisaje protegido Laguna de Rocha. Disponible en: www.mvotma.gub.uy. Último acceso 10 de marzo de 2014.

ANEXO 2. Imágenes de los sitios de muestreo seleccionados en la Barra de la Laguna de Rocha.



FIGURA 1. Imagen Satelital de la BLR tomada y modificada de Google Earth 2013. Los puntos verdes indican los 5 sitios de muestreo seleccionados.



FIGURA 2. Sitio C1 (34°39' 48,6" S) (54°13' 14,3" W).



FIGURA 3. Sitio C2c (34°39' 48,2" S) (54°13' 26,4" W).



FIGURA 4. Sitio C2t (34°39' 49,7" S) (54°13' 33,4" W).



FIGURA 5. Sitio C3 (34°39' 52,2" S) (54°13' 33,4" W).



FIGURA 6. Sitio C4 (34°40' 01,3" S) (54°14' 01,9" W).

ANEXO 3. Artículo a ser sometido a la revista *Phyllomedusa*

Validity of Photo-Identification Technique to analyze natural marks in *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae)

Ernesto Elgue, Gisela Pereira, Federico Achaval-Coppes and Raúl Maneyro¹

Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay. ernestoelgue@gmail.com, rmaneyro@fcien.edu.uy

¹ Author of correspondence

Abstract

Validity of Photo-Identification Technique to analyze natural marks in *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). Individual animal identification is useful to answer diverse biological questions about their life story. Most of the techniques used to mark amphibians are invasive and can cause negative effects on individuals compromising their survival and the results of investigations. Photo-identification consists in identification of specimens based on photographic records, using colour-design patterns unique to each animal. This technique has showed successful results in several species. *Melanophryniscus montevidensis* is an anuran present in the Uruguayan Atlantic coast whose conservation is compromised. The general pattern of coloration is black with red and yellow blotches on the belly. In this study the technique of photo-identification assisted by software is validated for individual recognition in *M. montevidensis*, using natural marks. Field trips were performed over 16 months in which the ventral color pattern of specimens was photographed. The photos were edited and the software of photographic reconnaissance Wild-ID 1.0 was run. An efficiency of 100% was obtained in the visual recognition and 90% in the detection of recaptures using the software. The use of photo-identification from natural marks is an effective technique in this species, because the color pattern used was highly variable among individuals and remained unchanged in individuals over time. It is important to use software to assist the photo-identification, because it makes feasible the treatment of large databases.

Keywords: *Melanophryniscus montevidensis*, photo-identification, natural marks

Resumen

Validez de la técnica de fotoidentificación con marcas naturales en *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). La identificación individual de animales es muy útil para responder diversas preguntas biológicas relacionadas con su historia de vida. La mayoría de las técnicas utilizadas para marcar anfibios son invasivas y pueden causar efectos negativos sobre los individuos, comprometiendo su sobrevivencia y los resultados de las investigaciones. La Fotoidentificación consiste en identificar especímenes en base a registros fotográficos, usando patrones de diseño-coloración únicos para cada animal. Esta técnica ha mostrado resultados exitosos en varias especies. *Melanophryniscus montevidensis* es un anuro presente en la costa atlántica uruguaya cuya conservación se encuentra comprometida. El patrón general de coloración es negro con manchas rojas y amarillas en el vientre. En este estudio se valida la técnica de fotoidentificación asistida por

software para el reconocimiento individual en *M. montevidensis*, utilizando marcas naturales. Se realizaron salidas durante 16 meses en las que se registró fotográficamente el patrón ventral de coloración de los ejemplares. Las fotografías fueron editadas y se utilizó el software de reconocimiento fotográfico Wild-ID 1.0. Se obtuvo una eficacia del 100% en el reconocimiento visual y 90% en la detección de recapturas empleando el software. El uso de la fotoidentificación a partir de marcas naturales es una técnica efectiva en esta especie, ya que el patrón de coloración analizado resultó altamente variable entre individuos e invariable en un mismo individuo a través del tiempo. Es importante utilizar un software para asistir la tarea de fotoidentificación, ya que hace viable el tratamiento de grandes base de datos.

Palabras claves: *Melanophryniscus montevidensis*, fotoidentificación, marcas naturales

Introduction

Individual identification of animals is very useful for answering several biological questions related to demographic, reproductive or ethological aspects, as valuation of life rate, migrations, or body growth, among other (Williams *et al.* 2002; Cove and Spínola 2013). Thus, various different methods for marking amphibians have been developed through time: toe-clipping, marks for injection of elastomers, cold, heat, silver nitrate or tattoo, and application of chips or transponders (Ferner 2007; Donnelly *et al.* 2001). Natural markers as well as molecular markers like microsatellites can also be used (Jehle and Amtzen 2002). The ideal technique for marking will be the one that has no effects on health or on animal behavior could last during the period of study and could be of easy application with low cost (Ferner 2007). Meeting these criteria simultaneously is very difficult, hence the choice of an adequate technique will depend on the objectives and limitations of the research and the species under study.

The most used technique for individual identification of amphibians has been toe-clipping, owing to its easy application and low cost. However, occasionally and similar to other invasive techniques, toe-clipping has been proved to have negative consequences on individuals, affecting the survival of animals, hence the results of the study (Davies and Ovaska 2001; Bloch and Irschick 2004). Photo-identification methods (PIMs) using natural marks is a non-invasive technique which requires the individual to have permanent external phenotypic differences. Although this technique has been used in amphibians (Donnelly *et al.* 2001), difficulties for its appliance or the high costs made it a delicate choice (production of analogical drawings or photos). Today, such difficulties were solved with the development of digital photography. The efficiency of the technique depends upon the

velocity and qualification of the researcher to identify individuals; however the more the photographic database accumulated, the more complex turns to be (Gamble *et al.* 2008; Hastings *et al.* 2008; Hiby *et al.* 2009; Sherley *et al.* 2010). Software allowing an easy photo-identification have recently been developed, from the database an algorithm chooses the photos that are more similar for visual confirmation, making the analysis of photos more accessible (Bolger *et al.*, 2011).

Methods of photo-identification have been used and proved successfully in anurans of the genus *Melanophryniscus* (Caorse *et al.* 2013; Abadie 2012), since this organism show great individual variation in its coloration (Maneyro and Carreira 2012). *M. montevidensis* is distributed throughout the Uruguayan Atlantic coast and south Rio Grande do Sul, Brasil. It is black with red and yellow marks on palms and lower abdomen, this latter very variable among individuals. The distribution of this species has been notably reduced during the last decades, and hence is considered an endangered species according to IUCN (Langone 2004). The declination of the species has been attributed to the increase in urbanization (Langone 1995; Maneyro *et al.* 1995), and recently, also to the climatic change as a potential cause, especially for future situation in short and medium terms (Toranza and Maneyro 2013). The biological information of this species is essential in order to be able to establish conservation parameters, and the utilization of non-invasive techniques is important to avoid compromising wild populations. The objective of the present work is to validate the technique of photo-identification based on software using natural markers in *M. montevidensis*.

Materials and Methods

Specimens from *Melanophryniscus montevidensis* were captured in the Barra de la Laguna de Rocha (Rocha, Uruguay). To get the specimens 16 field trips were necessary from September 2011 till February 2013. The individuals were captured manually, kept in individual vessels (maintained in suitable humidity and temperature) and identified with a number. When taking photos, the animals were placed upside down on a white color plastic area. Care was taken to get the toads clean and dry at the moment of photography, in order to be able to appreciate all the ventral marks. The photographic cameras used were NIKON, L810 (16.0 MP) and P500 (12.1 MP) models. Use of anesthesia was not necessary. Two to

four photos of each individual were taken. Then, after 24 hours maximum, the animals were released in the same place of capture.

In the laboratory, the most suitable photo was selected and edited. When necessary, bright and contrast were modified, and each photo was cut in order to obtain only an image of the abdomen (Figure 1). The objective of such cut was to minimize the sources of error due to the photo background and invariable regions of individual coloration (head and extremities) (Bolger *et al.* 2011). Wild-ID 1.0 software used for the analysis of recaptures of photographs (Bolger *et al.* 2011), returns the 20 photos that were more similar to the analyzed one for visual confirmation of recapture. The software is based on an algorithm that recognizes and compares “key points independent from the scale” (Lowe 2004), and then, a score of coincidence among pairs of photos is elaborated.

Before applying the proof of effectiveness of computer-assisted matching (CAM), 410 photographs were selected and revised in a visual matching (VM), comparing at pairs every possible combination of photos. Then, photos were processed by the Wild-ID software. Data of position in the ranking of comparison and the similitude coefficient among pairs were taken of the software. For VM as well as CAM the time employed to obtain results was measured. The completed database was also analyzed, as a sixteen months sampling, to determine the correspondent results of the total recaptures (total number of recaptures, percentages of monthly recaptures, recidivist recaptures). The software was run in a computer with a processor Intel Core i5-3337U CPU 1.8GHz, 4,0GB RAM y Windows 8 (64-bit).

Results

A total of 1878 photographs were analyzed. The edition of each photo lasted from 30 to 60 seconds. The time required for VM of recaptures to prove the efficiency of the software lasted around 10 hours, meanwhile the time required for CAM lasted no more than 3 hours 40 minutes: 10 minutes for the analysis of the software and about 3 hours 30 minutes for visual confirmation.

The sample of photographs used in the proof of the software had 20 recaptures, all of them recognized through VM, while CAM recognized 18, showing a 90% efficacy. From the detected recaptures, fourteen were the first option in the list of individuals returned by the software, one in a second place, another in a fourth place, another one in the

fifth place and the last one in the thirteenth place. The coincidence scores varied from 10^{-6} to 0.23. No false positives were detected in the recognition of recaptures.

A total of 268 recaptures were recognized throughout the database, including 29 individuals that were recaptured more than once. The percentage of recaptures was greater when the number of sampling events that gave photos to the database ($r^2=0,83$; $p<0,0001$) was greater, showing a more explanatory relationship than the size of database ($r^2=0,76$; $p<0,0001$). Also the relationship found between the number of captures and the number of recaptures was significant in field trips ($r^2=0,84$; $p<0,0001$) (Figure 2).

Taking into account the recaptures recognized by the software, the one with greater temporal distance had fourteen months difference (Figure 3). To verify whether there was temporal variation in the coloration of all the recaptured specimens, a further revision of photos was carried out and no changes in the pattern of marks were found. It is important to note that 66 individuals showed deformities in the limbs: lack of fingers, lack of phalanges or feet malformation.

Discussion

PIM showed good results for *M. montevidensis*, with a 100% effectiveness in the case of VM. CAM seems to be an effective technique, although it was not free of error; a main strength of this technique is the short time required for the analysis, taking into account the enormous database encountered. The software contributes mostly to such strength, since it decreases over half the time used when compared to the manual analysis of photos. Another relevant characteristic of the technique is the absence of false positives (pair of photos taken wrongly as recaptures), which is due to the way the software is managed, since recaptures require the operator to have a visual confirmation. The characteristics of the natural marks analyzed in this species, with a high degree of variation among individuals (Maneyro and Carreira 2012) could also positively contribute to it. At this point, the implications are very important because some analysis at population and individual levels (estimations of body growth, identification of migrations) would not consider false data to estimations (Krebs 1999).

The results of analyze all photographs showed feasibility of working with a big database for photo-identification in *M. montevidensis*. As it was thought, the recaptures are

more abundant when: higher was the capture in a sampling event, more numbers of samples have been made, and when greater the available database is.

Taking into account the conservation status of *M. montevidensis* (Langone 2004) and the characteristics of coloration (Maneyro and Carreira 2012), photo-identification through natural markers seems to be one of the best alternatives for individual identification, because: low economic cost, analysis of photographs does not require a long time, procedure is simple and shows good results. Another kind of marking, of invasive type, would be risky to the viability of the population, owing to the scale of the study, and because the possible health impact of these techniques have not been proved. As an important fact, toe-clipping could be less efficient on these animals, because a high percentage of abnormalities in the limbs were observed (4.1 %), which could generate an additional error in the analysis of recaptures. On the other hand, although some authors state that the ablation of phalanges is a viable technique for amphibians (Phillot *et al.* 2007), the number of publications that demonstrate its inconvenience for a good health of the animal as well as for the results of the research, is increasing (McCarthy and Paris 2004; Parris and McCarthy 2008).

Working on *Litoria genimacultada*, Kenyon *et al.* (2009) found a low PIM efficiency (61.15%), contrary to the present results. This difference is probably consequence of the characteristics of the natural marks analyzed, since the coloration of the specimens of *L. genimacultada* is not so variable among co-specific individuals, as it is in *M. montevidensis*. Besides, these authors reported variation of natural marks during the 10 months period of the research. Other similar studies with species of the genus *Melanophryniscus*, show that the efficiency of the PIM although similar to the reported data in the present paper, never reached the 100% as in VM (Caorsi *et al.* 2012; Abadie 2012). This is probably because *Melanophryniscus admirabilis* has less variable coloration than *M. camaraensis* compared to *M. montevidensis*. However, it is strange since when photos were analyzed by the software, the efficacy was lower in *M. montevidensis*. This difference could be because of the factors that affect the software, like the uniform quality of photos or the background of the image (Bolger *et al.* 2011; Abadie 2012). Improving these aspects, better results of CAM could probably be got.

The utilization of PIM is an effective technique in this species and could also be efficient for other species of the same genus with similar coloration patterns (as in *M.*

sanmartini, *M. atroluteus* or *M. dorsalis*). Such efficiency may be based on the pattern of analyzed coloration in the present study, resulting highly variable among individuals and invariable in a unique individual, through a period of time. Besides, the non-invasive character and the low cost of this technique worthwhile to be emphasized, demonstrating to be the best option for the individual identification of the species. It is of relevance to rely on the possibility of using software to help with photo-identification, hence the processing of a great database would be possible.

Acknowledgements

We are very grateful to Zulema Coppes for translating this study to english version, and María Pía Aristimuño for their corrections. To Michelle Abadie and Valentina Caorsi, for assisting in the use of Software Wild-ID. We would like to thank the colleagues of "Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados", and the park rangers of Laguna de Rocha for supporting our field work. The authors acknowledge the financial support of Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

References

- Abadie, M. 2012. Fotoidentificação como alternativa de marcação não invasiva para o sapinho microendêmico *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae). Trabajo de conclusión de curso, Bacharelado Em Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Brazil.
- Bloch, N. and D. J. Irschick. 2004. Toe-clipping dramatically reduces clinging performance in a pad-bearing lizard (*Anolis carolinensis*). *Journal of Herpetology*, 37: 293-298.
- Bolger, D. T., B. Vance, T. A. Morrison and H. Farid. 2011. Wild- id user guide: pattern extraction and matching software for Computer-assisted photographic mark-recapture analysis http://software.dartmouth.edu/macintosh/academic/Wild-id_1.0.0.zip.
- Caorsi, V.Z., R. R. Santos and T. Grant. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South American Journal of Herpetology*, 7: 79-84.

- Cove, M.V. and M. Spínola. 2013. Pairing noninvasive surveys with capture-recapture analysis to estimate demographic parameters for *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) from an altered habitat in Costa Rica. *Phyllomedusa*, 12: 107-115.
- Davis, T. M. and K. Ovaska. 2001. Individual recognition of amphibians: Effects of toe clipping and fluorescent tag- ging on the salamander *Plethodon vehiculum*. *Journal of Herpetology*, 35: 217-225.
- Donnelly, M. A., C. Guyer, J. E. Juterbock and R. A. Alford. 2001. Techniques for marking amphibians. In: W. R. Heyer, M. A. Donnelly , R. W. McDiarmid , L. C. Hayek and M. S. Foster (Eds), *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Washington, Smithsonian Institution Press. 349 pp.
- Ferner, J.W. 2007. *A Review of Marking and Individual Recognition Techniques for Amphibians and Reptiles*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Salt Lake City, 72 pp.
- Gamble, L., S. Ravela and K. Mc Garigal. 2008. Multi-scale features for identifying individuals in large biological databases: an application of pattern recognition technology to the marbled salamander *Ambystoma opacum*. *Journal of Applied Ecology*, 45: 170-180.
- Hastings, K. K., L. A. Hiby. and R. J. Small. 2008. Valuation of computer-assisted photograph-matching system to monitor naturally marked harbor seals at Tugidak Island, Alaska. *Journal of Mammalogy*, 89: 1201-1211.
- Hiby, L., P. Lovell, N. Patil, N. S. Kumar, A. M. Gopaldaswamy and K. U. Karanth. 2009. A tiger cannot change its stripes: using a three-dimensional model to match images of living tigers and tiger skins. *Biology Letters*, 5: 383-386.
- Jehle, R. and J. W. Arntzen. 2002. Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal*, 12: 1-9.
- Kenyon, N., A. D. Phillott, and R. A. Alford. 2010. Temporal variation in dorsal patterns of juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology*, 5: 126-131.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological Methodology*. Menlo Park, California, 619 pp.
- Langone, J. A. 1995. Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). *Museo Zoológico Municipal Dámaso Antonio Larrañaga, Serie Divulgación*, 5: 1-123.

- Langone, J. 2004. *Melanophryniscus montevidensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. URL: www.iucnredlist.org.
- Lowe, D. 2004. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International Journal of Computer Vision*, 60: 91-110.
- Maneyro, R., F. Forni and M. Santos. 1995. Los anfibios del departamento de Rocha. PROBIDES, Serie Divulgación Técnica, 1: 1-24.
- Maneyro, R. & S. Carreira. 2012. Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la Fuga. Montevideo. 207 pp.
- McCarthy, M. A. and K.M. Parris. 2004. Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology*, 41: 780-786.
- Parris, K. M. and M.A. McCarthy. 2008. Toe clipping of anurans for mark-recapture studies: acceptable if justified. *Herpetological Review*, 39: 148-149.
- Phillott, A. D., L. F. Skerratt, K. R. McDonald, F. L. Lemckert, H. B. Hines, J. M. Clarke, R. A. Alford and Speare R. 2007. Toe-clipping as an acceptable method of identifying individual anurans in mark recapture studies. *Herpetological Review*, 38: 305–308.
- Sherley, R. B., T. Burghardt, P. J. Barham, N. Campbell and I. C. Cuthill. 2010. Spotting the difference: towards fully automated population monitoring of African penguins *Spheniscus demersus*. *Endangered Species Research*, 11: 101-111.
- Toranza, C. and M. Maneyro. 2013. Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa*, 12: 97–106.
- Williams, B.K., J. D. Nichols and M. J. Conroy. 2002. Analysis and management of animal populations: modeling, estimation and decision-making. Academic Press, San Diego. 817 pp.



Figure 1. Variation of ventral coloration of *Melanophryniscus montevidensis*. Photos taken from the analyzed database.

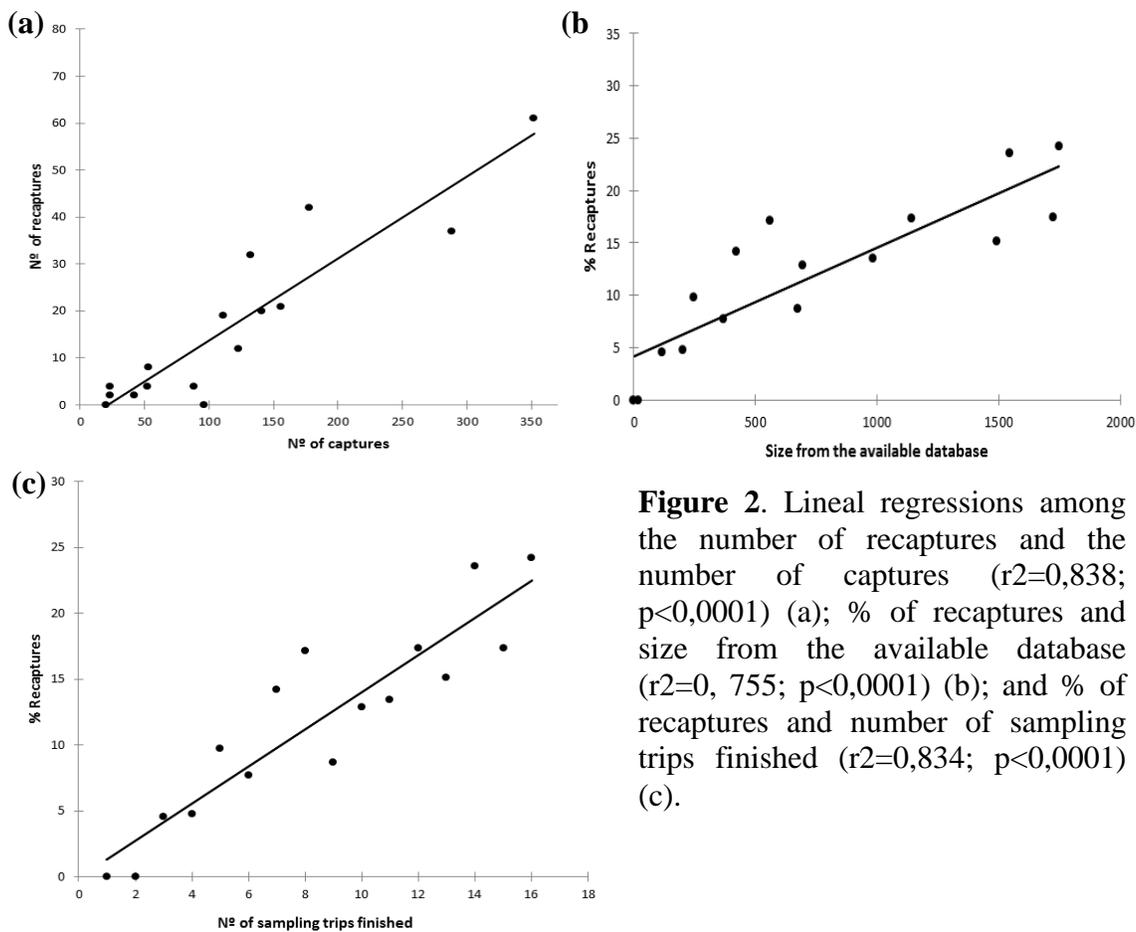


Figure 2. Lineal regressions among the number of recaptures and the number of captures ($r^2=0,838$; $p<0,0001$) (a); % of recaptures and size from the available database ($r^2=0,755$; $p<0,0001$) (b); and % of recaptures and number of sampling trips finished ($r^2=0,834$; $p<0,0001$) (c).



Figure 3. Photographs of a specimen of *Melanophryniscus montevidensis* recaptured with a 14 months difference.