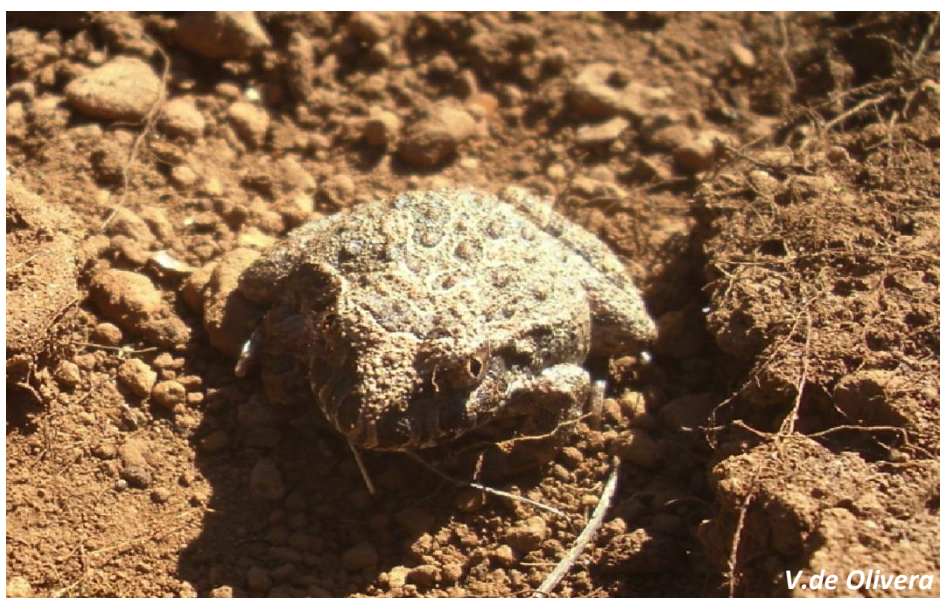


**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE
Limnomedusa macroglossa
(Duméril & Bibron, 1841) (ANURA: ALSODIDAE)
EN URUGUAY**



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

Valeria Fabiana de Olivera López

Orientador: Dr. Raúl Maneyro
Co-orientador: Dr. Arley Camargo

Tribunal: Raúl Maneyro, Arley Camargo y Gisela Pereira

- Montevideo, 2017 -

Imagen de portada:

Ejemplar hembra de *Limnomedusa macroglossa* colectado en el Departamento de Tacuarembó el 20 de Enero de 2014 actualmente depositado en la Colección Zoología Vertebrados de la Facultad de Ciencias, bajo el acrónimo ZVC-B.

A la mujer
que siempre me apoyó y me dio fuerzas para seguir adelante
con mi pasión a pesar de las dificultades,
a la luchadora que me enseñó que un tropezón no es caída y
que de todas las experiencias vividas se aprende,

a mi mamá,

Graciela Myriam López Páez

A la memoria de ella y
a mi hermano del corazón
(mi cuñadito más lindo del mundo)

Gonzalo Rafael Soumastre Laítano

siempre con una enorme sonrisa y un abrazo apretado,
rezongando cuando era necesario para que fuera mejor cada día,
presionando, en definitiva, ayudándome a crecer.

A mis guerreros,
que lucharon hasta el final,
va dedicado este trabajo,
fruto de largo tiempo de esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

Le quiero agradecer a **Raúl Maneyro**, por abrirme las puertas del laboratorio hace tanto tiempo y permitirme llevar a cabo esta pasantía, por iniciarme, incentivarme y guiarme en este camino tan sacrificado que es la investigación en nuestro país, por sus rápidas correcciones y sugerencias para que este trabajo saliera.

A **Arley Camargo**, que a pesar de la distancia y las pocas veces que nos vimos personalmente, siempre estuvo dispuesto a dar una mano, aportando ideas para mejorar este trabajo.

A **Gisela Pereira**, por aceptar ser parte del tribunal y siempre ofrecer su ayuda para lo que necesitara, tanto en el trabajo de laboratorio como facilitándome bibliografía y sus aportes personales.

A **todos mis compañeros** del Laboratorio de Sistemática e Historia Natural, por la ayuda, aclarando dudas que fueron surgiendo en el camino, por los momentos compartidos tanto en el laboratorio como en las salidas de campo.

A **Melitta Meneghel**, por sus consejos y charlas “interminables” que te animan a seguir adelante.

A **Jeny Bastida**, por estar siempre, en las buenas y en las no tanto, por aguantarme, escucharme y decir siempre las palabras justas (esas que te levantan cuando te estás cayendo), por su amistad, que es el tesoro más lindo que cultivamos día a día, incluso cuando los tiempos no nos permiten vernos tanto.

A mi compañero de ruta, **Pablo Toriño**, por siempre darme fuerzas, ánimo y coraje para seguir adelante en esta pasión que compartimos por la Ciencia, por su amor, pero sobre todo por su paciencia, porque reconozco que no fue fácil.

A mi hermana, **Liliana**, que es una gran guerrera, mi ejemplo a seguir por su entereza, convicción y principios, la persona que me acompañó y guió en la vida, siempre hombro a hombro, la una por la otra.

A mis sobrinos, **Laura y Rodrigo**, que son la gran alegría de mi vida y que día a día renuevan mis fuerzas para avanzar.

Y por último, **A LA VIDA**, pues sin ella nada de esto hubiera sido posible, y porque si bien tuvo sus tragos amargos, también trajo esperanza y felicidad.

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN	6
2	INTRODUCCIÓN	7
2.1	<i>PATRONES REPRODUCTIVOS, ESTACIONALIDAD Y FACTORES ABIÓTICOS.....</i>	<i>7</i>
2.2	<i>INVERSIÓN REPRODUCTIVA.....</i>	<i>8</i>
2.3	<i>DIMORFISMO SEXUAL</i>	<i>9</i>
2.4	<i>LIMNOMEDUSA MACROGLOSSA</i>	<i>10</i>
3	OBJETIVOS.....	12
4	HIPÓTESIS.....	12
5	MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1	<i>COLECTA</i>	<i>13</i>
5.2	<i>ANÁLISIS DE DATOS</i>	<i>13</i>
5.2.1	<i>Variables reproductivas</i>	<i>13</i>
5.2.1	<i>Variables morfológicas.....</i>	<i>15</i>
5.2.2	<i>Variables abióticas.....</i>	<i>16</i>
6	RESULTADOS.....	17
6.1	<i>VARIACIÓN MENSUAL</i>	<i>17</i>
6.2	<i>RELACIONES ENTRE EL TAMAÑO CORPORAL Y LAS VARIABLES REPRODUCTIVAS.....</i>	<i>18</i>
6.3	<i>RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES REPRODUCTIVAS EN FUNCIÓN DE LA LOCALIDAD</i>	<i>18</i>
6.4	<i>DINÁMICA DE LOS CUERPOS GRASOS Y VARIACIÓN GONADAL</i>	<i>19</i>
6.5	<i>RELACIONES ENTRE CUERPOS GRASOS, DESARROLLO GONADAL Y EL VOLUMEN DEL TRACTO DIGESTIVO</i>	<i>20</i>
6.6	<i>DIMORFISMO SEXUAL</i>	<i>20</i>
6.7	<i>FACTORES ABIÓTICOS Y REPRODUCCIÓN</i>	<i>21</i>
7	DISCUSIÓN	22
7.1	<i>VARIACIÓN MENSUAL</i>	<i>22</i>
7.2	<i>RELACIONES ENTRE EL TAMAÑO CORPORAL Y LAS VARIABLES REPRODUCTIVAS.....</i>	<i>23</i>
7.3	<i>MASA DE LOS OVARIOS Y TAMAÑO CORPORAL EN FUNCIÓN DE LA LOCALIDAD</i>	<i>24</i>
7.4	<i>DINÁMICA DE LOS CUERPOS GRASOS Y VARIACIÓN GONADAL</i>	<i>25</i>
7.5	<i>RELACIONES ENTRE CUERPOS GRASOS, DESARROLLO GONADAL Y EL VOLUMEN DEL TRACTO DIGESTIVO</i>	<i>25</i>
7.6	<i>DIMORFISMO SEXUAL</i>	<i>26</i>
7.7	<i>FACTORES ABIÓTICOS Y REPRODUCCIÓN</i>	<i>27</i>
8	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	29
9	BIBLIOGRAFÍA CITADA	31
10	FIGURAS	36
11	TABLAS.....	49

1 RESUMEN

Los ciclos reproductivos de los anfibios están sujetos a controles hormonales y responden a distintas variables ambientales. En este trabajo se describe el patrón reproductivo de *Limnomedusa macroglossa* (Duméril & Bibron, 1841) en Uruguay. Los individuos se colectaron entre octubre 2013 y marzo 2015, y se encuentran depositados en la Colección Zoología Vertebrados de Facultad de Ciencias (UdelaR). Se obtuvieron las variables reproductivas: fecundidad, inversión reproductiva, masa de los ovarios y volumen testicular, y se compararon con variables ambientales (temperatura, precipitaciones y humedad). Además se determinó la masa de los cuerpos grasos, el volumen ocupado por el tracto digestivo y 11 variables morfométricas. Se estableció el período reproductivo en base al grado de desarrollo gonadal. Se analizaron 98 ejemplares: 49 hembras (11 adultas/38 juveniles) y 49 machos (20 adultos/29 juveniles). Se encontraron variaciones mensuales significativas en todos los parámetros analizados. Las hembras maduras se hallaron en los meses cálidos. Se encontraron asociaciones significativas entre la masa de los ovarios/volumen testicular y el largo hocico-cloaca. Utilizando modelos mixtos y teniendo en cuenta la localidad como variable aleatoria, se encontró una relación directa entre la masa de los ovarios y el tamaño corporal/volumen ocupado por el tracto digestivo; y una relación inversa con los cuerpos grasos. En otro análisis, se encontró el mismo patrón, esta vez relacionando la inversión reproductiva con las variables antes mencionadas. Se halló una relación directa entre la masa de los cuerpos grasos y el volumen testicular. La especie exhibe dimorfismo sexual, ya que las hembras son más grandes que los machos, y estos presentan caracteres sexuales secundarios (callos nupciales oscuros). Por otro lado, no se hallaron diferencias en la forma corporal. Se establecieron correlaciones significativas entre las variables reproductivas y la temperatura, así como con la humedad. En función de los resultados obtenidos, podemos inferir que la temporada reproductiva para *L. macroglossa* abarca los meses cálidos del año. Los factores abióticos actuarían como disparadores de la temporada reproductiva, con machos y hembras invirtiendo sus recursos de forma diferencial a lo largo del año. Los individuos no dejan de alimentarse durante el período reproductivo, asignando la energía para la vitelogénesis en hembras, y para la actividad de vocalización en machos. El dimorfismo sexual encontrado en el tamaño estaría determinado por una tasa de crecimiento diferencial entre los sexos, a favor de las hembras, ya que hembras más longevas, pueden alcanzar un mayor tamaño corporal, y por ende podrían alojar ovarios más grandes, aumentando el *fitness*. Por otro lado, entre los machos, aquellos más grandes tendrían mayor *fitness*. En conclusión, la actividad reproductiva de *Limnomedusa macroglossa* es la esperada para una especie estacional típica de ambientes templados con un patrón prolongado de reproducción.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Patrones reproductivos, estacionalidad y factores abióticos

Los ciclos reproductivos de los anfibios están sujetos a controles hormonales y responden a distintas variables abióticas (Prado & Haddad, 2005; Stebbins & Cohen, 1997). En zonas templadas, la actividad reproductiva varía en función de la temperatura y las precipitaciones (variables que inciden en la estacionalidad reproductiva y en los patrones de vocalización de los machos) (Duellman & Trueb, 1994), ocurriendo generalmente en primavera o a principios del verano (Stebbins & Cohen, 1997). Otro factor influyente es el fotoperíodo, que puede actuar como señal ambiental, determinando los ritmos biológicos, y como consecuencia de ello, los patrones de estivación, espermatogénesis o vocalización en los machos (Both *et al.*, 2008), así como la ovogénesis, vitelogénesis u oviposición en las hembras (Vit & Caldwell, 2009). Todos estos factores regulan los patrones reproductivos, que además pueden ser influenciados por la disponibilidad y utilización del microhábitat, el tamaño corporal, el modo de reproducción y el cuidado parental (Duellman & Trueb, 1994).

Wells (1977) propuso dos patrones reproductivos en los anuros: el explosivo y el prolongado. En el primero, el período reproductivo se extiende desde algunas horas a pocos días, y la reproducción ocurre en cuerpos de agua temporales, a donde las hembras y los machos llegan de forma sincrónica. En especies con patrón reproductivo prolongado, los eventos reproductivos pueden tener una duración de varias semanas o meses, y ambos sexos arriban asincrónicamente a los charcos reproductivos. Los machos defienden territorios y compiten vocalizando desde posiciones fijas para atraer a las hembras que son selectivas con sus parejas. Es importante destacar que no todas las especies se ajustan precisamente a uno u otro patrón (Stebbins & Cohen, 1997). Estos patrones son los extremos de un continuo, donde la mayoría de las especies adoptan estrategias intermedias (Prado & Haddad, 2005). Por otro lado, se ha demostrado variación intra-específica, resultado de adaptaciones a las condiciones presentes en distintas localidades, a microambientes de un mismo sitio o como secuela de respuestas plásticas que los individuos exhiben frente a un estímulo ambiental, determinando estrategias reproductivas únicas (Wells, 1977; 2007; Barboza, 2014). Los patrones reproductivos extremos pueden asociarse con estrategias de historia de vida también opuestas: inversión reproductiva tardía (asociada al tamaño) o temprana (no asociada al tamaño) (Camargo *et al.*, 2008; Valdez & Maneyro, 2016).

2.2 Inversión reproductiva

La adquisición evolutiva de las diferentes estrategias debe equilibrar la cantidad de energía invertida en la reproducción, crecimiento y supervivencia, así como tener en cuenta el compromiso entre la calidad y la cantidad de la descendencia (Roff, 2002; Castellano *et al.*, 2004). La inversión reproductiva se define como la proporción de recursos disponibles que invierten los organismos de cierta edad en la reproducción durante un período de tiempo definido (Gadgil & Bossert, 1970). El método más común para medir dicha inversión consiste en establecer proporciones entre la masa, tamaño o volumen de las gónadas o la puesta y la masa, tamaño o volumen corporal (Crump, 1974). En general, el volumen de la puesta está positivamente correlacionado con el tamaño de la hembra, o más directamente con el espacio disponible en su cavidad abdominal (Kaplan & Salthe, 1979). Esta correlación fue demostrada por Prado & Haddad (2005) en siete de las especies que analizaron, revelando además la existencia de una correlación positiva entre el tamaño de la hembra y el tamaño de los ovocitos, independientemente del modo reproductivo.

Por otro lado, en algunos casos esta correlación no es tan evidente. Mientras las hembras pequeñas de *Physalaemus riograndensis* direccionan parte de su energía en crecer, las hembras grandes encuentran más ventajoso invertir en más ovocitos en vez de aumentar su tamaño corporal (Pereira & Maneyro, 2012). Del mismo modo, Camargo *et al.* (2008) encontraron una alometría positiva significativa en *Physalaemus gracilis* y *P. biligonigerus*, revelando que las hembras más grandes invierten proporcionalmente más en su descendencia. Entonces, podríamos argumentar que existiendo alometría positiva, las hembras adultas de mayor tamaño son las que presentan mayor esfuerzo reproductivo proporcional, ya que pueden albergar mayor cantidad de ovocitos o aumentar el tamaño de los mismos. Por lo tanto, el crecimiento se puede considerar como una inversión para futuros eventos reproductivos (Camargo *et al.*, 2005), situación evidenciada en especies con patrón reproductivo de tipo prolongado (Pereira & Maneyro, 2012). Cuando no existe alometría positiva, es más favorable reproducirse de forma temprana, invirtiendo más cantidad de energía en cada evento reproductivo antes que priorizar el crecimiento, esta característica mayormente se encuentra en especies con un patrón reproductivo del tipo explosivo. La solución que encuentran algunas de estas especies para lograr un mayor éxito reproductivo sin necesidad de acrecentar su tamaño, es conservar reservas de ovocitos maduros para lograr más de una puesta consecutiva si las condiciones para la ocurrencia del evento reproductivo son apropiadas (Pereira, 2014; Pereira & Maneyro, 2017). Además, existen otros factores (cantidad de alimento, competencia y depredación), que pueden limitar la cantidad de energía direccionada a cada evento reproductivo (Camargo *et al.*, 2005).

Las relaciones entre los rasgos de la historia de vida de las especies se deben a dos procesos: la adquisición de recursos y su posterior asignación. Para la mayoría de los compromisos de la historia de vida, se supone que la energía es el principal recurso limitante y está influenciado por muchos factores (la disponibilidad de alimento, el tiempo de forrajeo, así como la tasa/eficiencia de digestión y absorción de nutrientes). En este caso, la adquisición total será la energía total adquirida por un individuo y la asignación será la proporción de esa energía asignada a los diferentes rasgos como crecimiento, reproducción y supervivencia. La asignación diferencial a estructuras y funciones genera compromisos en la expresión de estos rasgos. Por ejemplo, la asignación de más energía a un rasgo reduce la energía disponible para los otros, resultando en correlaciones negativas entre los rasgos competidores (King *et al.*, 2011).

En los anfibios la energía se almacena como lípidos en órganos especiales situados en el extremo anterior de las gónadas, llamados cuerpos grasos (Duellman & Trueb 1994; Prado & Haddad, 2005). Su volumen, varía en función de la temperatura y la dieta de los individuos (Jørgensen, 1986), por lo cual son estructuras que se consideran buenas indicadoras del estado nutricional a nivel individual (Jørgensen, 1992). Teniendo esto en cuenta, es posible comparar la inversión reproductiva entre individuos con respecto a la adquisición de recursos. Hay modelos (Y-model) que predicen que la existencia de variación en la adquisición de los recursos a nivel individual, puede enmascarar los compromisos subyacentes de la asignación, explicando de esta manera por qué las relaciones negativas no siempre se encuentran entre los rasgos. Debido a esto, podría estar oculta una relación inversa entre la inversión y dos rasgos clave: crecimiento versus reproducción (King *et al.*, 2011).

2.3 Dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual en el tamaño se define como la diferencia en la longitud del cuerpo o masa de machos y hembras sexualmente maduros (Kupfer, 2007; Nali *et al.*, 2014). Entre los anuros, esta relación suele estar sesgada a favor de las hembras. El dimorfismo sexual puede tener importantes consecuencias en la ecología y etología animal, y es un aspecto fundamental para la comprensión de la evolución de los rasgos en la historia de vida y en los sistemas de apareamiento (Kupfer, 2007).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar los patrones de dimorfismo sexual en anuros como resultado de la selección sexual (Shine, 1979; Woolbright, 1983; Arak, 1988). Según Wells (2007), el dimorfismo sexual es producto de la selección natural o sexual, y se manifiesta a través del tamaño corporal y en ocasiones por los caracteres sexuales secundarios. Estos permiten diferenciar a machos de hembras. En anuros hay estructuras que solo

están presentes en los machos como los sacos vocales (un rasgo relacionado con el comportamiento de vocalización), y los callos nupciales (asociados a especies que se reproducen en el agua). Sin embargo, Monnet & Cherry (2002) propusieron que el dimorfismo sexual es, en gran medida, una función de las diferencias en las estrategias de historia de vida entre los sexos. En este sentido, la variación en el tamaño puede explicarse en función de la estructura de edades entre los sexos en las poblaciones reproductivas, y por lo tanto la selección sexual ejercería un efecto secundario.

2.4 *Limnomedusa macroglossa*

Limnomedusa Fitzinger, 1843 es un género monotípico y el más basal dentro de la familia Alsodidae (Barrio, 1971; Gudynas & Gehrau, 1981; Frost *et al.*, 2006; Pyron & Wiens, 2011). *Limnomedusa macroglossa* (Fig. 1), conocida como “rana de las piedras o de las correderas”, “rapids frog” o “Ju’í”, es la única especie del género luego de que se sinonimizara con *L. misionis* Schmidt, 1944 (Barrio, 1971; Langone & Prigioni, 1985), fue descrita en 1841 por Duméril & Bibron con el nombre de *Cystignathus macroglossus*. Se la describe como una especie de mediano a gran tamaño, con su dorso en tonos de marrón y gris con glándulas conspicuas y su vientre de un blanco immaculado. Se destacan los ojos por poseer la pupila de forma vertical. Como caracteres sexuales secundarios, los machos presentan un único saco vocal y oscuros callos nupciales en los primeros dedos de sus patas delanteras. En cuanto a la dieta, se indicó que se trata de una especie insectívora (Maneyro & Carreira, 2012).

Limnomedusa macroglossa presenta distribución limitada, ya que es especialista de hábitat, ocupando un biotopo de serranías, a lo largo de afloramientos rocosos de origen basáltico (a veces constituyendo pedregales) y suelos superficiales tipo rigosoles y litosoles, con o sin vegetación (Maneyro & Carreira, 2012). Se encuentra generalmente en ambientes secos de tipo xerófilo y con pequeños cuerpos de agua transitorios (directamente relacionados con las lluvias), como cañadas o pequeños arroyos, por lo que se la puede considerar un buen indicador ambiental (Gudynas & Gerhau, 1981; Núñez *et al.*, 2004; Winck *et al.*, 2006; Both *et al.*, 2008). Los individuos de esta especie se encuentran principalmente semienterrados u ocupando depresiones que ellos mismos elaboran o en refugios estrechos bajo rocas que se ajustan a su cuerpo, por lo que es considerada una especie con hábito terrestre y semifosorial (Gudynas & Gerhau, 1981).

Su distribución abarca el sur de Brasil (desde Paraná hasta Rio Grande do Sul), el noreste de Argentina (Misiones y Entre Ríos), el sureste de Paraguay (Alto Paraná) y casi todo el territorio uruguayo (Frost, 2017).

En lo que respecta a la variación geográfica de la especie en Uruguay, se ha encontrado una conectividad entre las cuencas hidrográficas a través de los cursos de agua, debido a la dispersión de los individuos en el estadio larval, y a nivel terrestre no se descarta el movimiento de los adultos entre parches. Como corolario, se estableció un patrón de aislamiento heterogéneo por distancia, el cual mantiene la estabilidad poblacional y diversidad genética en las Quebradas del Norte del país (Fernández, 2016).

Se ha observado que el período reproductivo en esta especie abarca los meses cálidos del año. Los machos comienzan a vocalizar en las noches menos frías de finales de agosto/principios de setiembre (Both *et al.*, 2008; Kaefer *et al.*, 2009; Maneyro & Carreira, 2012), en sitios cercanos a cuerpos de agua lóticos (Both *et al.*, 2008) o en sistemas lénticos (Gudynas & Gerhau, 1981; Langone & Prigioni, 1985; Kaefer *et al.*, 2009). Se reportó que cuando los días se tornan más largos y consecuentemente la temperatura aumenta, ocurren los amplexos y la oviposición. Las larvas se desarrollan desde setiembre hasta fines de febrero (Kaefer *et al.*, 2009), y se mimetizan con el entorno a expensas de su coloración críptica (Gehrau & de Sá, 1980; Segalla & Langone, 2004; Both *et al.*, 2008; Maneyro & Carreira, 2012).

En poblaciones de Rio Grande do Sul se reportó la existencia de dimorfismo sexual y se clasificó a la especie con el tipo de reproducción prolongado (Kaefer *et al.*, 2009). No obstante, las poblaciones uruguayas no han sido estudiadas en detalle, y tal circunstancia es relevante ya que en este país se encuentra la mayor parte de la distribución de la especie.

3 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es describir la biología reproductiva de *Limnomedusa macroglossa* (Anura: Alsodidae) en Uruguay. Los objetivos específicos incluyen estudiar:

- el patrón de actividad reproductiva en hembras y machos a escala mensual;
- el poder predictivo que poseen los factores abióticos (temperatura, precipitaciones y humedad) para la actividad reproductiva;
- la posible relación entre la fecundidad y el tamaño corporal en hembras y entre el volumen testicular y el tamaño corporal en machos;
- la asociación entre los cuerpos grasos, el desarrollo gonadal y el volumen del contenido en el tracto digestivo;
- la posible relación de dependencia entre el tamaño corporal, los cuerpos grasos y el volumen del contenido en el tracto digestivo con la masa de los ovarios en función de la localidad geográfica, y
- la eventual existencia de dimorfismo sexual en base a caracteres morfométricos.

4 HIPÓTESIS

- Debido a que *L. macroglossa* es una especie que presenta una estrategia prolongada de reproducción, su actividad reproductiva dependerá de la energía acumulada en los cuerpos grasos (durante los meses de inactividad) y estará relacionada con factores abióticos (temperatura, precipitaciones y humedad).
- La estrategia reproductiva prolongada favorece la presencia de dimorfismo sexual en el tamaño, producto de la competencia entre machos y la selectividad de las hembras.
- Se espera que exista un patrón de alometría positiva en la inversión reproductiva y una asociación negativa entre ésta y las reservas energéticas.
- También se espera obtener una relación entre las variables reproductivas y las localidades geográficas, a causa de un patrón de aislamiento por distancia encontrado en la especie.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta

Para describir la biología reproductiva se utilizaron 98 individuos que fueron colectados durante el período comprendido entre octubre 2013 y marzo 2015, en los Departamentos de Rivera, Tacuarembó, Lavalleja, Maldonado y San José (Fig. 2). Todos los ejemplares estudiados se encuentran depositados en la Colección Zoología Vertebrados de la Facultad de Ciencias (ZVCB) o en la Colección del Centro Universitario de Rivera (CURCB).

5.2 Análisis de datos

5.2.1 Variables reproductivas

El período de actividad reproductiva de las hembras se determinó a partir del grado de desarrollo de las gónadas. Para la clasificación de los ovocitos se siguió a Pereira & Maneyro (2017). Se consideraron hembras maduras aquellas que contenían ovarios con ovocitos maduros (Fig. 3A). Estos ovarios fueron extraídos para poder tomar su masa (MO) y cuantificar posteriormente el número de ovocitos (fecundidad = F). Además se calculó el promedio del diámetro de los ovocitos (DO) en cada individuo en base a diez medidas tomadas de cada ovario. Se estimó la inversión reproductiva (IR) como el cociente entre la masa del ovario (MO) y el largo hocico-cloaca (SVL).

Por otra parte, en los machos se midieron los testículos (Fig. 3B), registrando el ancho y largo (AT) y (LT) respectivamente, para luego calcular su volumen (VT), el cual se modela como un caso particular de elipsoide:

$$VT = 4/3 \pi (LT/2) (AT/2)^2$$

También se registró por observación directa la presencia o ausencia de callos nupciales (CN) en los machos (Fig. 3C).

Aplicando la misma fórmula del elipsoide, se halló el volumen de los ovocitos (VO) de hembras maduras. Se tomó el diámetro más grande como el largo (LO) y el más chico como el ancho (AO).

$$VO = 4/3 \pi (LO/2) (AO/2)^2$$

En todos los individuos los cuerpos grasos (CG) (Fig. 3B) fueron extraídos, y posteriormente fueron pesados (cuando su tamaño lo permitió), o categorizados según su tamaño relativo. Se establecieron categorías (0 = ausencia, 1 = medio, 2 = abundante) relativas al volumen ocupado por el

contenido de alimento en el tracto digestivo (DIG), considerando al estómago, intestino delgado y grueso. Las categorías 1 y 2 se diseñaron en base a observación directa por transparencia de las paredes del tracto: si el individuo tenía espacio disponible para más alimento en la cavidad respectiva (Cat. 1) o si por el contrario no había más espacio disponible (Cat. 2).

Se analizó la variación mensual de IR, F y MO mediante ANOVA, ya que los datos mostraron una distribución normal, mientras que la variación en CG y VT se analizó a través del test de Kruskal-Wallis, puesto que estos datos no presentaron distribución normal. Finalmente para estudiar la correlación entre SVL y F/MO/VO se realizaron análisis de regresión entre estas variables.

Se testó la posible relación entre las variables reproductivas de machos/hembras adultos (VT, IR, F) y la masa de los CG y DIG mediante modelos de regresión lineal múltiple. Para ello, se utilizaron los residuos de la regresión de las variables antes mencionadas con respecto al SVL, con el objetivo de reducir el efecto del tamaño corporal.

Para analizar la relación de dependencia entre las variables MO y SVL, masa de los CG y DIG se utilizó un modelo lineal de efectos mixtos. En los modelos mixtos, los efectos fijos se ajustan mediante parámetros como el intercepto y la pendiente en una regresión, mientras que los aleatorios son estrictamente variables aleatorias que no se observan pero cuya distribución puede estimarse mediante la varianza de una distribución normal (Bates, 2010). Para este análisis se utilizó el paquete “lme4” (Bates *et al.*, 2015) del software estadístico R (R Core Team, 2016).

Para realizar este análisis se utilizaron todas las hembras maduras capturadas para el estudio reproductivo ($n = 11$) y todas las variables utilizadas (MO, SVL, CG, DIG) fueron estandarizadas con la función *scale* de R (R Core Team, 2016).

Se verificó que no se violaran los supuestos básicos (linealidad, ausencia de colinealidad, homocedasticidad, normalidad de los residuos, ausencia de puntos influyentes e independencia de los datos) para descartar errores tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando esta es cierta) y II (aceptar la hipótesis nula cuando ésta es falsa) del modelo (Zuur *et al.*, 2010).

Ya que se trata de un modelo de efectos mixtos, se seleccionaron variables fijas y aleatorias. El SVL, CG y DIG se escogieron como variables fijas. Por otro lado, el territorio o localidad de un animal históricamente se considera como una variable de efecto aleatorio, ya que los individuos colectados son generalmente una sub-muestra aleatoria del conjunto de la población y la respuesta a analizar se espera que esté correlacionada dentro

de cada uno de esos territorios. Es por eso que se tomó la localidad como variable aleatoria para este análisis. Además, si la localidad se toma como un factor aleatorio, el modelo permitirá extrapolar la relación encontrada más allá de estas localidades.

Se partió diseñando varios modelos. Desde uno simple que contuviera solo intercepto aleatorio para la localidad hasta uno más complejo en el cual no solo se le permite tener diferente intercepto a la localidad, sino que también tener diferente pendiente para el efecto del SVL, con el objetivo de ver cuál de ellos se ajustaba mejor al set de datos. También se construyeron modelos nulos para contrastar con los anteriores, retirándoles las variables fijas y manteniendo la variable aleatoria. Para el diseño de los modelos utilizados se siguió a Baayen *et al.* (2008), Zuur *et al.* (2009) y Winter (2013).

Todos los modelos diseñados se ajustaron a un modelo lineal mixto por estimación de máxima verosimilitud restringida (REML), que es una modificación de la estimación por máxima verosimilitud que es más precisa para el modelado de efectos mixtos (Baayen *et al.*, 2008). Según los valores obtenidos de REML (Tabla 1) y los resultados de posteriores comparaciones mediante test de razón de verosimilitud con la función *anova* de los modelos diseñados, se pudo determinar que el modelo que mejor se ajusta a los datos corresponde a un modelo de pendiente aleatoria.

Por lo que, el modelo nulo quedó definido como:

$$MO \sim 1 + (1 + SVL \mid LOCALIDAD) \quad \text{Mod (0)}$$

Por otro lado, se definieron dos modelos para explicar las relaciones entre las variables:

$$MO \sim SVL + (1 + SVL \mid LOCALIDAD) \quad \text{Mod (1)}$$

$$MO \sim SVL + CG + DIG + (1 + SVL \mid LOCALIDAD) \quad \text{Mod (2)}$$

5.2.1 Variables morfométricas

Para cada individuo se registró el sexo por análisis gonadal y se midieron 11 variables morfológicas utilizando un calibre digital (0,01 mm): largo hocico cloaca (SVL), ancho mandibular (MW), largo de la cabeza (HL), distancia interorbital (IOD), diámetro del ojo (ED), distancia internarinas (IND), distancia ojo-narina (SED), largo del brazo (ARML), largo de la tibia (TIB), largo del tarso (TRL) y largo del metatarso (META) (Fig. 4). Utilizando estas variables, se estudió la eventual existencia de dimorfismo sexual por medio de análisis univariados y multivariados.

Los sexos se compararon a través de un análisis multivariado no paramétrico, en el que se tiene en cuenta la permutación de la varianza para cada variable (PERMANOVA). Las diferencias en la forma entre machos y hembras se examinaron a través de un Análisis de Componentes Principales y Clúster Jerárquico. Para minimizar el efecto del tamaño en estos análisis, se utilizaron los residuos de las regresiones entre las variables morfométricas y el SVL.

5.2.2 Variables abióticas

Mediante análisis de regresión lineal y logarítmica, se correlacionaron las variables reproductivas de hembras (IR y F) y machos (VT) con los datos de temperatura media (T), precipitación acumulada (PP) y humedad relativa media (% H) mensuales de los lugares de estudio durante el período de colecta de los individuos. Los datos climáticos fueron proporcionados por el Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET) y por el Instituto Nacional de Estadística (INE) (Fig. 5).

Para los análisis estadísticos realizados en este trabajo se utilizaron los softwares de uso libre R 3.2.5 (R Core Team, 2016), Past 3.02a (Hammer *et al.*, 2001; Hammer, 2014) y Statistica v. 10 (StatSoft. Inc., 2011).

6 RESULTADOS

6.1 Variación mensual

Se encontró que de los 98 ejemplares colectados para este estudio, 49 fueron hembras (11 adultas y 38 juveniles) y 49 machos (20 adultos y 29 juveniles).

Se observó un máximo de individuos ($n = 25$), conteniendo los cuatro grupos etarios (machos: adultos y juveniles; hembras: adultas y juveniles) en el mes de Feb 2015 (Fig. 6), coincidiendo con el registro más alto del porcentaje de humedad (69,73%). Se encontraron hembras maduras en Oct y Dic 2013, Ene, Nov 2014 y Feb 2015, registrándose máximos de tres individuos en Dic 2013 y Nov 2014. El mes donde se encontró mayor abundancia de hembras maduras (21,43%, $n = 3$) y machos adultos (42,86%, $n = 6$) fue en Dic 2013, estos resultados coinciden con la mayor temperatura registrada en este estudio (26,2 °C). Los machos adultos se encontraron en todos los meses menos en Abr 2014 (cuando sólo se colectaron individuos juveniles de ambos sexos). El 68,37% de los individuos fueron juveniles, éstos se encontraron en casi todos los meses muestreados menos en Mar 2015, donde sólo se registró un macho adulto. Si se consideran los cambios relativos entre juveniles y adultos, se observó que los primeros dominan en los meses de enero y febrero, mientras que los segundos en noviembre y diciembre.

En todo el período de muestreo se hallaron hembras maduras en los meses más cálidos, presentando ovocitos inmaduros, maduros y atrésicos (Fig. 3A).

En octubre y diciembre de 2013 se hallaron los valores más altos de IR y F respectivamente, mientras que el VT presentó valores bajos en esos meses. Por otro lado, para febrero de 2015 se observaron los valores más bajos de IR y F y el valor más alto de VT (Fig. 7).

Se encontraron variaciones mensuales significativas ($p < 0.001$) de las variables reproductivas en hembras entre los meses de octubre, diciembre 2013, enero, noviembre 2014 y febrero 2015: IR ($F = 44.75$, $DF = 10$) (Fig. 8), F ($F = 105.1$, $DF = 10$) (Fig. 9), MO ($F = 19.54$, $DF = 11$). Mientras que en los machos las variaciones mensuales significativas ($p < 0.001$) encontradas en el volumen testicular correspondieron a los meses de octubre, diciembre 2013, enero, febrero, marzo, noviembre 2014 y febrero, marzo 2015: VT (adultos: $H = 26.69$ (Fig. 10); juveniles: $H = 27.71$).

Por otro lado, también se encontraron variaciones mensuales significativas ($p < 0.001$) en la masa de los CG de hembras y machos en los meses antes mencionados: CG hembras (adultas: $H = 15.78$; juveniles: $H = 56.26$) y CG machos (adultos: $H = 29.27$; juveniles: $H = 42.76$).

6.2 Relaciones entre el tamaño corporal y las variables reproductivas

No se encontró una relación lineal entre SVL y F ($r^2 = 0.19$, $p = 0.172$), así como tampoco entre SVL e IR ($r^2 = 0.18$, $p = 0.187$). No se observó ninguna relación de dependencia entre el tamaño en hembras adultas y el volumen de los ovocitos ($r^2 = 0.11$, $p = 0.306$).

Sin embargo, se halló una significativa relación lineal entre SVL y la masa de los ovarios en hembras adultas ($r^2 = 0.31$, $p < 0.074$) (Fig. 11).

A modo de verificación se realizó una regresión lineal entre la masa de los ovarios y el volumen de los ovocitos, encontrándose una fuerte relación entre las variables ($r^2 = 0.77$, $p < 0.001$) (Fig. 12).

Por otro lado, para los machos adultos se evidenció una correlación entre SVL y VT ($r^2 = 0.45$, $p < 0.001$) (Fig. 13).

6.3 Relaciones entre las variables reproductivas en función de la localidad

Los modelos **(0)**, **(1)** y **(2)** tuvieron un criterio de convergencia REML de: 24.2; 19.9 y 16.3 respectivamente (Tabla 1). Se ajustaron a un número de observaciones de 11 y el número de niveles del factor de agrupación para el efecto aleatorio de la localidad fue de 4, correspondiendo a: Arapey (Salto), Cuñapirú (Rivera norte), Lunarejo (Rivera noroeste) y Pan de Azúcar (Maldonado).

En función de la localidad, se obtuvo que la MO alcanzó valores máximos en Cuñapirú, mientras que los mínimos se reportaron para Lunarejo, con Arapey y Pan de Azúcar mostrando valores intermedios (Fig. 14A). Analizando los valores medios encontrados en la relación entre la MO y la localidad y el contexto geográfico de donde provinieron esos ejemplares (Fig. 14B), se observó una tendencia creciente en la masa de los ovarios a medida que nos movemos en un gradiente longitudinal de oeste a este en el territorio uruguayo, aunque con leve apoyo estadístico (Fig. 14C). Latitudinalmente no se encontró ningún tipo de relación.

Mientras que la localidad de Arapey presentó los valores máximos para cada una de las variables fijas estudiadas (SVL-CG-DIG), Lunarejo se destacó por presentar los valores mínimos en SVL-CG, presentando DIG con una amplia variación. Por otro lado, Cuñapirú no se destacó en ninguna de las variables fijas estudiadas.

En el estudio del modelo nulo **(0)** se obtuvo una relación inversa entre el intercepto y MO con una estimación ($\beta = -0.512 \pm 0.155$; $t = -3.293$). La varianza de los residuos fue de $s^2 = 0.132$ y un desvío estándar $s = 0.363$.

Analizando el modelo **(1)** se obtuvo una relación directa entre la variable fija SVL y la variable dependiente MO, con una estimación de ($\beta = 1.125 \pm 0.51$; $t = 2.206$). Se encontró que una muy baja variabilidad no pudo ser explicada por el término aleatorio de la localidad, resultando en una varianza de los residuos de $s^2 = 0.126$, $s = 0.355$.

Del modelo **(2)** resultaron dos relaciones directas y una inversa. Se obtuvo una relación directa entre SVL y MO con una estimación de ($\beta = 1.16 \pm 0.586$; $t = 1.982$) y entre DIG y MO ($\beta = 0.359 \pm 0.251$; $t = 1.431$). Por otro lado se encontró una relación inversa entre CG y MO ($\beta = -0.815 \pm 0.77$; $t = -1.058$). En este caso, la varianza de los residuos también fue baja $s^2 = 0.116$, $s = 0.34$. Se encontraron correlaciones entre los efectos fijos. El SVL se correlacionó negativamente con CG y DIG ($r = -0.51$; $r = -0.333$ respectivamente), mientras que entre CG y DIG no hubo correlación ($r = 0.07$).

De la comparación de los modelos estudiados, resultó que la masa de los ovarios depende directa y significativamente del largo hocico-cloaca (modelo **(1)**; $p < 0.01$), mientras que cuando se incluyen CG y DIG esta relación encuentra un apoyo estadístico ligeramente menor (modelo **(2)**; $p < 0.05$) (Tabla 2).

6.4 Dinámica de los cuerpos grasos y variación gonadal

Se testó la posible asociación entre la masa de los CG y las variables reproductivas, hallándose una significativa relación lineal y exponencial entre la masa de los CG y VT en los machos adultos: $r^2 = 0.49$, $p < 0.003$, $r = 0.70$ (Fig. 15); mientras que en los juveniles no se encontró asociación: $r^2 = 0.07$, $p = 0.22$. Por otro lado, en las hembras no se pudo comprobar tal relación entre la masa de los CG e IR/F/MO ($r^2 = 0.06$, $p = 0.46$; $r^2 = 0.003$, $p = 0.86$; $r^2 = 0.02$, $p = 0.62$, respectivamente).

6.5 Relaciones entre cuerpos grasos, desarrollo gonadal y el volumen del tracto digestivo

Mediante los modelos de regresión lineal múltiple realizados, se pudo comprobar que IR, F y VT están influenciadas por al menos una de las variables independientes introducidas en el análisis (CG y DIG).

En el caso de las hembras maduras, la IR tuvo una fuerte y significativa correlación negativa con los CG ($b^* = -0.92$, $r^2 = 0.70$, $p < 0.004$), mientras que con el DIG se encontró una alta influencia positiva ($b^* = 0.686$, $r^2 = 0.70$, $p < 0.01$) (Tabla 3). También se analizó la F en relación a CG y DIG, no hallándose algún tipo de relación entre ellas ($r^2 = 0.11$, $p = 0.25$).

Para los machos adultos, se encontró que el VT se correlacionó positivamente con los CG ($b^* = 0.931$, $r^2 = 0.87$, $p < 0.001$), sin embargo no se encontró una relación con el DIG ($b^* = 0.042$, $r^2 = 0.87$, $p = 0.65$) (Tabla 4). Todos los individuos analizados ($n = 19$) contenían alimento en el tracto digestivo.

6.6 Dimorfismo sexual

Las hembras maduras mostraron una media de SVL (56.53 ± 4.99 mm, $n = 11$) significativamente mayor a la de los machos adultos (48.41 ± 3.38 mm, $n = 20$) ($t = 5.386$, $p < 0.001$). Cuando se introdujeron todas las variables morfométricas, la comparación de sexos realizada a través del test no paramétrico PERMANOVA, también resultó significativa, $F = 3.25$, $p < 0.03$. Al estudiar el coeficiente de varianza de las variables morfométricas analizadas, ninguna se destacó. La que obtuvo la menor varianza fue META con 9.37 y la que tuvo la máxima fue ARML con 12.73.

En el Análisis de Componentes Principales se encontraron 10 componentes, de los cuales PC1 explicó el 58.55% de la varianza, mientras el PC2 el 15.19%; mientras que a partir del tercero los porcentajes se vuelven notoriamente más bajos (Fig. 16). Tomando en cuenta los dos primeros componentes, se explica el 73.74% de la varianza total. En el gráfico de dispersión se observan los puntos con un alto grado de solapamiento (Fig. 17). Las variables que más aportaron a PC1 en función a los valores de los coeficientes de carga, *loadings*, fueron: META (0.724) y TIB (0.47), mientras que las que obtuvieron los valores más bajos fueron: IND, ED, SED, IOD (Fig. 18). Para PC2 los mayores *loadings* los obtuvieron: TIB (0.463) y TRL (0.324), mientras que dentro de los que menos aportaron se destaca la variable META, quien resultó con -0.663 (Fig. 19), aunque este componente no mostró ser explicativo, ya que en el ploteo de todos los componentes, el PC2 resultó por

debajo de la curva del modelo broken stick (Fig. 16). Las variables más significativas se correlacionaron con su respectivo componente.

Adicionalmente, se realizó un clúster jerárquico, obteniéndose un dendrograma, en el cual se observa una topología de hembras y machos en congruencia con el análisis de componentes principales, determinando la ausencia de dimorfismo sexual morfométrico en la especie (Fig. 20).

Por medio de análisis cualitativos se comprobó la presencia de callos nupciales oscuros por encima del primer y segundo dedo de la pata delantera en machos adultos.

6.7 Factores abióticos y reproducción

Se encontró una relación lineal y logarítmica entre IR y porcentaje de humedad mensual ($r = 0.65$, $p < 0.03$; $r^2 = 0.42$) (Fig. 21), pero cuando se analizó la F contra ese factor ambiental, no se encontró ninguna relación ($r = 0.24$, $p = 0.47$; $r^2 = 0.06$).

Se encontró una correlación negativa entre IR y la temperatura mensual ($r = -0.63$, $p < 0.04$; $r^2 = 0.39$) (Fig. 22), mientras que F no se relacionó con ese factor abiótico ($r = -0.28$, $p = 0.39$; $r^2 = 0.08$).

No se halló una asociación significativa entre la IR y las precipitaciones mensuales ($r = 0.25$, $p = 0.46$; $r^2 = 0.06$). En el caso de la F y ese factor abiótico, tampoco se pudo establecer la existencia de algún tipo de relación ($r = -0.15$, $p = 0.66$; $r^2 = 0.02$).

Se encontró una débil correlación entre el VT y el porcentaje de humedad mensual registrado ($r = 0.39$, $p < 0.08$; $r^2 = 0.154$) (Fig. 23). Mientras que no se halló ningún tipo de relación entre VT y la temperatura ($r = -0.11$, $p = 0.66$; $r^2 = 0.01$) ni con las precipitaciones mensuales registradas ($r = 0.01$, $p = 0.96$; $r^2 = 0.0001$).

7 DISCUSIÓN

7.1 Variación mensual

Dado que se constató la presencia de hembras maduras sólo en los meses más cálidos que además coinciden con los registros de humedad y temperatura más altos del estudio, podemos suponer una temporada reproductiva para *L. macroglossa* que abarca los meses de octubre hasta febrero. Esto concuerda con lo reportado en varios estudios anteriores para esta especie en Uruguay, en donde se describe una actividad reproductiva que incluye los meses cálidos del año (Gudynas & Gehrau, 1981; Langone & Prigioni, 1985; Maneyro & Carreira, 2012) y por Kaefer *et al.* (2009) para una población en Rio Grande do Sul. Los resultados obtenidos pueden interpretarse según Wells (1977) como los esperables para una especie con un patrón prolongado de reproducción. La mayor abundancia de machos adultos en relación a las hembras maduras, es lo esperable para anuros con patrones de reproducción no explosivos (Wells, 1977). El período reproductivo reportado en este estudio, se debe a la significativa variación mensual encontrada en la inversión reproductiva y fecundidad de hembras maduras, así como en el volumen testicular y la presencia de callos nupciales oscuros en machos adultos. Además, las hembras parecen prepararse para la temporada reproductiva aumentando la inversión anticipadamente, a diferencia de los machos, los cuales incrementan progresivamente el volumen testicular, terminando la temporada con valores máximos. La variación mensual en el volumen testicular se ha reportado en trabajos previos, proponiéndose como un buen indicador de estacionalidad en otras especies con reproducción prolongada (Pereira *et al.*, 2015).

Se encontró una variación mensual significativa en la masa de los cuerpos grasos de individuos adultos. Probablemente esto se deba a una diferencia en la manera en que los individuos invierten los recursos a lo largo del año, siendo mínimos justo antes y durante la temporada reproductiva. Se han reportado reducciones, durante la temporada de reproducción, de la masa de los órganos que almacenan energía para machos de varias especies con reproducción prolongada (Wells, 2007). Para hembras de zonas templadas se ha encontrado que la masa de los cuerpos grasos son óptimas justo antes del comienzo del invierno, alcanzando el mínimo durante la época reproductiva (Wells, 2007). La variación estacional de los cuerpos grasos fue correlacionada con los períodos de latencia durante la temporada desfavorable y con la producción de gametos y vitelo en varias especies de anfibios (Oliveira & Andrade, 1997). En lo que respecta a individuos juveniles, en este trabajo se encontró una variación mensual en la masa de las estructuras que almacenan

la energía. En la bibliografía, no se ha reportado un patrón claro de variación en el tamaño de los cuerpos grasos en individuos juveniles de algunas especies, sugiriéndose que en esa etapa ontogenética la prioridad es utilizar toda la energía almacenada para el crecimiento (Pereira *et al.*, 2015).

7.2 Relaciones entre el tamaño corporal y las variables reproductivas

El tamaño corporal influye en la ecología de un animal, a pesar de que es una característica muy plástica, ya que su expresión en el fenotipo de los animales es una compleja interacción entre la genética y el ambiente (Green, 2015). La reproducción está influenciada por la variación del tamaño corporal, esto fue demostrado en especies con crecimiento indeterminado, en donde mayores tamaños se asocian con mayores *fitness* reproductivos (Camargo *et al.*, 2008).

En este trabajo, la ausencia de relación entre el tamaño corporal y las variables fecundidad e inversión reproductiva en hembras maduras podría indicar que la asignación de recursos hacia la reproducción no depende del tamaño del animal, sino que podrían estar actuando otros factores como el estado nutricional de los individuos, la temperatura y las precipitaciones, lo que fue demostrado en trabajos previos (Prado & Haddad, 2005). En este estudio no se pudieron establecer patrones muy claros de dependencia entre las variables reproductivas y las abióticas, por lo que pueden estar influenciando otros caracteres (ej.: cantidad de energía almacenada en los cuerpos grasos, habilidad en la búsqueda de alimento, así como la disponibilidad de presas y el riesgo de ser predado, entre otras) o incluso puede deberse a la baja cantidad de hembras maduras colectadas, ya que podría no ser una muestra representativa. Puesto que no se halló una relación entre el tamaño corporal y el volumen de los ovocitos, queda descartado que las hembras más grandes dirijan sus recursos energéticos para obtener mayores tamaños en sus gametos, lo que deja a futuras interpretaciones que podría estar sucediendo en relación al tamaño de las puestas, ya que se podría estar frente a una especie con múltiples oviposiciones en cada evento reproductivo. Esta condición ya fue reportada en estudios anteriores (Prado & Haddad, 2005). Esto es coherente, ya que se trata de una especie con un modo reproductivo tipo 1 (Haddad & Prado, 2005), el modo más primitivo, en donde tanto los ovocitos como las larvas son acuáticos, y por lo general los primeros, poseen tamaños pequeños pero en contrapartida, las hembras oviponen una mayor cantidad, condición opuesta a la que ocurre en reproductores más terrestres (Gómez-Mestre *et al.*, 2012).

En contrapartida, el volumen testicular de machos adultos se correlacionó positivamente con el tamaño corporal. Por lo que, individuos más grandes tendrían volúmenes testiculares mayores y sumado al hecho de que se encontraron variaciones mensuales significativas en estas estructuras, se puede suponer un aumento de la masa testicular, fruto de la maduración de células espermatogénicas (Pereira *et al.*, 2015) luego de sucesivos eventos reproductivos durante la temporada. Entonces, los machos más grandes tendrían mayor *fitness* que los pequeños. Estos resultados también se han demostrado en otras especies de zonas templadas (Rodrigues *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2015; Elgue & Maneyro, 2017).

7.3 Masa de los ovarios y tamaño corporal en función de la localidad

Cuando se tomó en cuenta la localidad como una variable de efecto aleatorio a la hora de analizar la posible relación entre el tamaño corporal y la masa de los ovarios, se encontró una significativa relación directa entre las variables. Esta tendencia indica que, a medida que el tamaño del cuerpo aumenta, en proporción se puede destinar más espacio de la cavidad abdominal para alojar ovarios más pesados y por ende más grandes. Se podría argumentar que, hembras más longevas serían más grandes y podrían invertir más en sus gónadas, en comparación con hembras más jóvenes.

Por otro lado, cuando se analizó la relación de la MO y la localidad en un contexto geográfico, y pese a la tendencia creciente observada, de momento no es posible determinar si este gradiente responde a un efecto de muestreo influenciado por la baja cantidad de hembras maduras estudiadas.

Por otra parte, los contextos hidrográficos y eco-regionales de Uruguay tampoco contribuyen a hipotetizar sobre las posibles causas del gradiente encontrado. En el caso de las eco-regiones, se debe tener en cuenta que las hembras correspondientes a las localidades de Lunarejo y Cuñapirú se encuentran muy próximas al límite entre las eco-regiones Cuesta Basáltica y Cuenca Sedimentaria Gondwánica, cuyos límites no son bordes nítidos sino franjas eco-tonales, y además internamente son unidades heterogéneas (Brazeiro, 2015). Por otro lado, las cuencas hidrográficas involucradas en este estudio (Cuenca del Río Uruguay, subsector Cuenca del Río Negro - Cuenca del Río de la Plata y Frente Oceánico, subsector Cuenca Atlántica) presentan una importante diversidad de ambientes, entre 96 y 51 respectivamente. No obstante, las cuatro localidades aquí estudiadas (Arapey, Lunarejo, Cuñapirú y Pan de Azúcar) presentan ambientes de serranías de suelos superficiales con afloramientos rocosos, que se desarrollan en cotas de entre 300 y 500 metros de altura, por lo que constituyen subsistemas hidrológicos y ecológicos

relativamente homogéneos, no permitiendo en consecuencia hipotetizar sobre las posibles causas del gradiente encontrado en este trabajo (Achkar *et al.*, 2013).

7.4 Dinámica de los cuerpos grasos y variación gonadal

No se encontró una relación entre las variables reproductivas y la masa de los cuerpos grasos en hembras maduras. La ausencia de correlación entre estas estructuras y los ovarios, se puede interpretar a la luz de que la reproducción no es prioritaria para la asignación de estas reservas de energía. Por otro lado, se ha demostrado que los cuerpos grasos juegan un rol muy importante durante la vitelogénesis, tanto en especies de zonas templadas como tropicales, así como en la hibernación durante los meses más fríos del año (Jørgensen, 1992; Prado & Haddad, 2005).

Contrariamente, en los machos adultos, se evidenció una relación de dependencia entre el volumen testicular y los cuerpos grasos. Este resultado sugiere que los individuos pueden usar sus reservas como fuente de energía para la actividad reproductiva. El costo energético de la reproducción en machos ha sido muy estudiado. Se sabe que la mayor parte de la energía se gasta durante el cortejo, ya que se ha demostrado que el costo energético de la gametogénesis parece ser significativamente menor. La mayoría de los estudios le atribuyen a la vocalización la mayor inversión energética (Duffitt & Finkler, 2011). En este sentido, Kaefer *et al.* (2009) clasifican a los machos de *L. macroglossa* dentro de la estrategia etológica de “machos vocalizadores”, ya que se caracterizan por la emisión de llamadas de anuncio para atraer hembras receptivas.

7.5 Relaciones entre cuerpos grasos, desarrollo gonadal y el volumen del tracto digestivo

Cuando se tomó en cuenta cuanto influye el volumen que ocupa el contenido en el tracto digestivo en la relación entre los cuerpos grasos y el desarrollo de los ovarios, se registró un compromiso entre esas estructuras. Se puede establecer que para las hembras, la reproducción es prioritaria para la asignación de la energía contenida en los cuerpos grasos. Esta condición se ha reportado para otra especie de zona templada y patrón de reproducción prolongado (Pereira & Maneyro, 2012). El hecho de que todas las hembras maduras colectadas tuvieran ovocitos inmaduros y maduros, así como algo de contenido de alimento en el tracto digestivo, sugiere que no dejan de alimentarse durante la reproducción, ya que necesitan seguir invirtiendo energía para la vitelogénesis durante todos los meses que dura la estación reproductiva.

Por otro lado, en machos adultos cuando se analizó la posible relación entre el volumen testicular y los cuerpos grasos teniendo en cuenta el volumen que ocupa en la cavidad abdominal la presencia o ausencia de contenido en el tracto digestivo, se obtuvo una correlación directa y positiva entre la variable reproductiva y la energía, se estableció cierta sincronía entre las variables, por lo cual se puede postular que los machos de *Limnomedusa macroglossa* también se siguen alimentando durante la temporada reproductiva y además utilizan sus cuerpos grasos como reservas, esto también fue demostrado en otros estudios en especies con reproducción prolongada (Díaz-Páez & Ortiz, 2001; Pereira *et al.*, 2015), sin embargo no estaría influenciado por el volumen ocupado por el alimento en el tracto digestivo.

7.6 Dimorfismo sexual

Desde el punto de vista estadístico, y como sucede en más del 90% de las especies de anfibios anuros, se encontró un dimorfismo sexual en el tamaño en *Limnomedusa macroglossa*, con hembras más grandes que los machos (Shine, 1979). Estos resultados concuerdan con los encontrados en otro estudio en una población de *L. macroglossa* al sur de Brasil (Kaefer *et al.*, 2009). Algunas explicaciones de tal diferencia entre hembras y machos que se han dado en la bibliografía son: que la preferencia por hembras más grandes evolucionó porque éstas producen más ovocitos por puesta, aumentando de esa manera el *fitness* (Bionda *et al.*, 2011); la existencia de posible depredación diferencial de machos más grandes, ya que el largo período reproductivo los expone, haciéndolos más vulnerables a los depredadores (Camargo *et al.*, 2008); la selección sexual (Shine, 1979; Woolbright, 1983; Arak, 1988), la estructura de edades (Monnet & Cherry, 2002), entre otros argumentos.

Adicionalmente, se constató un carácter sexualmente dimórfico, el desarrollo de callos nupciales oscuros. Estos rasgos se expresan durante la temporada reproductiva en respuesta a los aumentos en los niveles de andrógenos circulantes, pero posteriormente regresan durante el período no reproductivo, aunque sin parecerse a la morfología que presentan las hembras maduras (Wells, 2007).

Sin embargo, desde el punto de vista morfológico, no hay diferencias entre los sexos. Por lo cual, podría tratarse de una especie en la que las hembras alcanzan la madurez sexual tardíamente, postergando la edad de su primer evento reproductivo, manteniendo la misma forma y proporciones corporales que los machos, pero alcanzando tamaños más grandes. Dicha diferencia en tamaño podría ser adaptativa para las hembras, ya que un mayor tamaño corporal permitiría aumentar el volumen de la cavidad abdominal, pudiendo alojar ovarios más grandes y en consecuencia, aumentando su

fitness. Por lo que la selección sexual no sería el mecanismo por el cual se determinaría la existencia de dimorfismo sexual en *Limnomedusa macroglossa*, sino que estaría determinado por la tasa de crecimiento diferencial entre los sexos (Monnet & Cherry, 2002; Wells, 2007).

7.7 Factores abióticos y reproducción

La actividad reproductiva de los anuros, que habitan zonas templadas con cierta estacionalidad, generalmente está influenciada por períodos de precipitaciones y de altas temperaturas (Prado *et al.*, 2005) así como también por el fotoperíodo y la humedad (Duellman & Trueb, 1994; Zank *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el fotoperíodo juega un rol muy importante en la estivación, espermatogénesis y vocalización en machos adultos de un ensamble de anuros de Rio Grande do Sul. El fotoperíodo se considera el factor más eficaz para estudiar el cambio estacional en animales ectotermos de ambientes templados, porque aporta información sobre la época del año (Both *et al.*, 2008).

Según estudios previos, *L. macroglossa* muestra un patrón de actividad reproductiva en los meses más calurosos del año en Uruguay (Maneyro & Carreira, 2012). Para una población en Rio Grande do Sul, se relacionó la actividad reproductiva con períodos donde el fotoperíodo es más largo, cuando la temperatura alcanza valores máximos, argumentando que estos factores juegan papeles importantes en los ciclos reproductivos de los anfibios, principalmente en especies de zonas templadas, debido a sus predecibles cambios estacionales. No así, los niveles de precipitaciones y humedad, ya que en Rio Grande do Sul, éstas se distribuyen uniformemente a lo largo del año, por lo que no las consideran factores de variación estacional que puedan explicar la actividad reproductiva en esa región (Kaefer *et al.*, 2009).

Los resultados de este estudio demostraron que los valores medios de precipitaciones no parecen incidir en la reproducción de *L. macroglossa*, esto es coherente, ya que se trata de una especie con reproducción acuática (modo reproductivo tipo 1) y prolongado, la cual tendería a ser menos dependiente de las precipitaciones (Haddad & Prado, 2005; Wells, 2007; Zank *et al.*, 2010), aunque las características micro-climáticas de cada lugar pueden ser importantes (Gudynas & Gehrau, 1981). Por otro lado, la actividad reproductiva de las hembras tuvo una correlación negativa con la media mensual de temperaturas registradas para las localidades estudiadas, por lo que se podría proponer que las hembras se preparan, incrementando la masa de los ovarios al inicio de la primavera para el arribo de la temporada reproductiva, oviponiendo en los meses más calurosos. Finalmente, se encontró una fuerte y significativa relación entre la inversión reproductiva en hembras maduras y el porcentaje de humedad mensual, así como también con el volumen testicular

de machos adultos. Da Silva *et al.* (2012), plantean que altos niveles de humedad conducen hacia una mayor cantidad y variedad de modos reproductivos y consecuentemente, en los lugares donde esto ocurre, hay una mayor diversidad filogenética dentro del grupo de los anfibios. Esto soporta la idea de que existe un continuo entre los patrones reproductivos descritos por Wells (1977) y que no todas las especies se adaptan a uno u otro patrón (Stebbins & Cohen, 1997). Camargo *et al.* (2005), Pereira & Maneyro (2012) y Pereira *et al.* (2015) demostraron que ni la temperatura ni las precipitaciones controlan exclusivamente los patrones reproductivos en dos especies con patrón prolongado de reproducción (*P. gracilis* y *P. riograndensis*), por lo cual, los ritmos internos, regulados por glándulas como la adenohipófisis, pueden ser los responsables de activar o inhibir la actividad gonadal en algunas especies, así como la posición filogenética que ocupen y cual estrategia reproductiva intermedia se adopte, entre reproductores prolongados y explosivos. Por otro lado, en reproductores explosivos se ha demostrado correlación entre las variables reproductivas y los factores abióticos (Valdez & Maneyro, 2016; Elgue & Maneyro, 2017; Pereira & Maneyro, 2017) reafirmando la idea del “oportunismo” para el evento reproductivo luego de una lluvia copiosa, por ejemplo para especies como *M. montevidensis* y *O. americanus* (Pereira, 2014; Valdez & Maneyro, 2016; Pereira & Maneyro, 2017).

8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La temporada reproductiva para *Limnomedusa macroglossa* en Uruguay abarcaría los meses cálidos del año. Los factores abióticos auspiciarían como punta pie inicial, permitiendo la activación gonadal y regulando su duración, con machos y hembras invirtiendo en forma diferencial sus recursos a lo largo del año. Los individuos no dejan de alimentarse durante la reproducción, asignando la energía a la vitelogénesis (en hembras) y a la vocalización (en machos). El dimorfismo sexual encontrado en el tamaño estaría determinado por una tasa de crecimiento diferencial entre los sexos, favoreciendo a las hembras, ya que hembras más longevas, alcanzando mayor tamaño corporal, podrían alojar ovarios más grandes, aumentando su *fitness*. Por otro lado, entre los machos, aquellos más grandes tendrían mayor *fitness*. En conclusión, la actividad reproductiva de *Limnomedusa macroglossa* corresponde con lo esperable para una especie estacional típica de ambientes templados con un patrón prolongado de reproducción.

Para futuros trabajos sobre biología reproductiva en esta especie, sería recomendable contar con la información de la masa de los individuos al momento de la colecta, ya que este dato da una medida más exacta del tamaño de la cavidad interna y define más claramente la capacidad ovárica en los anuros según trabajos previos (Prado & Haddad, 2005). Por otro lado, sería bueno realizar un mayor esfuerzo de muestreo, para obtener parejas en amplexo, capturarlas, marcarlas y reservarlas en contenedores apropiados hasta que las hembras realicen la oviposición y luego devolverlos al lugar de la colecta. Así se podrían estudiar posibles relaciones con el tamaño de la puesta. Además, la realización de esqueleto-cronología podría aportar valiosa información para determinar o estimar de forma más precisa la edad y compararlo con el tamaño de la puesta; así como también establecer una estructura de edades dentro de las poblaciones estudiadas.

Dado que no se detectó un patrón muy claro entre las variables reproductivas y la cantidad de cuerpos grasos en machos juveniles y en hembras maduras, sería interesante poder estudiar a futuro que sucede con la dinámica de otras moléculas reservorio de energía, como el glucógeno, tanto en el cuerpo como en el hígado, para poder determinar qué proporción de ésta se invierte en la reproducción. Esto se ha estudiado en varias especies durante la temporada reproductiva (Duffitt & Finkler, 2011).

Es importante mencionar, que algunos resultados reportados en este trabajo pueden estar influenciados por un artefacto de muestreo, dado que no se hallaron individuos en los meses más fríos (Mayo – Setiembre) en el período en el que este trabajo se llevó a cabo. Además, se constató que tampoco en

las colecciones biológicas se cuentan con datos pertenecientes a los meses fríos del año, por lo que se podría pensar que existen fenómenos subyacentes (mayor mortalidad, hibernación, entre otros) relacionados a la ausencia de individuos en esos meses.

9 BIBLIOGRAFÍA CITADA

Achkar, M., Domínguez, A. & Pesce, F. 2013. Cuencas hidrográficas del Uruguay. Situación y perspectivas ambientales y territoriales. Programa Uruguay Sustentable. Redes Amigos de la Tierra. 165 pp.

Arak, A. 1988. Sexual size dimorphism in body size: a model and a test. *Evolution*. 42: 820-825.

Baayen, R. H., Davidson, D. J. & Bates, D. M. 2008. Mixed-effects modeling with crossed random effects for subjects and items. *Journal of Memory and Language*. 59: 390-412.

Barboza, F. R. 2014. Retomando el concepto de plasticidad fenotípica en el estudio de los modos reproductivos de anfibios anuros. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* (2ª época). 23: 16-29.

Barrio, A. 1971. Sobre la coespecificidad de *Limnomedusa misionis* Schmidt y *L. macroglossa* (Duméril & Bibron) (Anura: Leptodactylidae) *Physis*. 37: 667-672.

Bates, D. M. 2010. Lme4: mixed-effects modeling with R. Disponible en: <http://lme4.r-forge.r-project.org/IMMwR/lrgprt.pdf>.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using. *lme4*. *Journal of Statistical Software*. 67: 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

Bionda, C., Lajmanovich, R., Salas, N., Martino, A. & Di Tada, I. 2011. Reproductive ecology of the common south american toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *Journal of Herpetology*. 45: 261-264.

Both, C., Kaefer, I. L., Santos, T. G. & Cechin, S. T. 2008. An Austral anuran assemblage in the Neotropics: Seasonal occurrence correlated with photoperiod. *Journal of Natural History*. 42: 205-222.

Brazeiro, A. 2015. Eco-Regiones de Uruguay: Biodiversidad, Presiones y Conservación. Aportes a la Estrategia Nacional de Biodiversidad. Facultad de Ciencias, CIEDUR, VS-Uruguay, SZU. Montevideo. 122 pp.

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.

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.

Castellano, S., Gucco, M. & Giacomini, C. 2004. Reproductive investment of female Green Toads (*Bufo viridis*). *Copeia*. 659-664.

Crump, M. L. 1974. Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Miscellaneous Publication of the Museum of Natural History of the University of Kansas*. 61: 1-68.

da Silva, F. R., Almeida-Neto, M., do Prado, V. H. M., Haddad, C. F. B. & de Cerqueira Rossa-Feres, D. 2012. Humidity levels drive reproductive modes and phylogenetic diversity of amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*. 39: 1720-1732.

- 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: MacGraw-Hill. 670 pp.
- Duffitt, A. D. & Finkler, M. S. 2011. Sex-related differences in somatic stored energy reserves of *Pseudacris crucifer* and *Pseudacris triseriata* during the early breeding season. *Journal of Herpetology*. 45: 224-229.
- Duméril, A. M. C. & Bibron, G. 1841. *Erpétologie générale ou histoire naturelle complète des reptiles*. Tome huitième. Librairie Encyclopédique de Roret. 792 pp. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/101245#page/5/mode/1up>
- Elgue, E. & Maneyro, R. 2017. Reproductive biology in a Uruguayan population of *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Meneville, 1838) (Anura, Microhylidae). *Cuadernos de Herpetología*. 31: 1-6.
- Fernández, C. 2016. Diversidad filogeográfica a múltiple escala en poblaciones de *Limnomedusa macroglossa* (Anura, Alsodidae) de Uruguay. MSc. Tesis. PEDECIBA. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 122 pp.
- Fitzinger, L. J. F. J. 1843. *Systema reptilium*. Fasciculus primus. Wien: Braumüller et Seidel.
- Frost, D. R. 2017. *Amphibian species of the world: an online reference*. Version 6.0 (23/08/2017). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B., de Sá, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Moler, P., Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green, D. M. & Wheeler, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of The American Museum of Natural History*. 297: 1-370.
- Gadgil, M. & Bossert, W. H. 1970. Life historical consequences of natural selection. *The American Naturalist*. 104: 1-24.
- Gehrau, A. & de Sá, R. 1980. Comunicación preliminar sobre larvas de *Limnomedusa macroglossa* (Amphibia: Leptodactylidae). *Resúmenes I Jornadas Ciencias Naturales*, Montevideo. 1: 85-86.
- Gomez_Mestre, I., Pyron, R. A. & Wiens, J. J. 2012. Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution*. 66: 3687-3700.
- Green, D. M. 2015. Implications of female body-size variation for the reproductive ecology of an anuran amphibian. *Ethology, Ecology & Evolution*. 27: 173-184.
- Gudynas, E. & Gehrau, A. 1981. Notas sobre la distribución y ecología de *Limnomedusa macroglossa* (Anura: Leptodactylidae) en Uruguay. *Iheringia. Serie Zoologia*. 60: 81-99.
- Haddad, C. F. B & Prado, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Brazilian Atlantic forest. *BioScience*. 55: 207-217.
- Hammer, Ø; Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4.1. 4: 1-9.

- Hammer, Ø. 2014. PAST: PAleontological STatistics. Version 3.02a. Reference manual. University of Oslo. 222 pp.
- Jørgensen, C. B. 1986. Effect of fat bodies excision in female *Bufo bufo* on psilateral ovary, with a discussion of fat body-gonad relationships. *Acta Zoologica*. 67: 5-10.
- Jørgensen, C. B. 1992. Growth and reproduction. In Feder, M. E. & Burggren, W. W. (Eds.). *Environmental physiology of the amphibians*. 439-466. University of Chicago Press. Chicago.
- Kaefer, I. L.; Both, C. & Zanini Cechin, S. 2009. Breeding biology of the rapids frog *Limnomedusa macroglossa* (Anura: Cycloramphidae) in southern Brazil. *Journal of Natural History*. 43: 1195-1206.
- Kaplan, R. H. & Salthe, S. N. 1979. The allometry of reproduction: an empirical view in Salamanders. *The American Naturalist*, Chicago. 113: 671-689.
- King, E. G., Roff, D. A. & Fairbairn, D. J. 2011. Trade-off acquisition and allocation in *Gryllus firmus*: a test of the Y model. *Journal of Evolutionary Biology*. 24: 256-264.
- Kupfer, A. 2007. Sexual size dimorphism in amphibians: an overview. 50-59. In Fairbairn, D. J., Blanckenhorn, W. & Székely, T. (Eds.). *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism*. Oxford University Press, Oxford.
- Langone, J. A. & Prigioni, C. M. 1985. Observaciones sobre una puesta de *Limnomedusa macroglossa* (D. & B., 1841) (Anura: Leptodactylidae). *Actas de las Jornadas de Zoología del Uruguay*. 83-86.
- Maneyro, R. & Carreira, S. 2012. *Guía de Anfibios del Uruguay*. Ediciones de la fuga. Montevideo. 207 pp.
- Monnet, J-M. & Cherry, M. I. 2002. Sexual size dimorphism in anurans. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 269: 2301-2307.
- Nali, R. C., Zamudio, K. R., Haddad, C. F. B. & Prado, C. P. A. 2014. Size-dependent selective mechanisms on males and females and the evolution of sexual size dimorphism in frogs. *The American Naturalist*. 184: 1-14.
- Núñez, D., Maneyro, R., Langone, J. & de Sá, R. O. 2004. Distribución geográfica de la fauna de anfibios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service*. 134: 1.
- Oliveira, C. & Andrade, U. J. A. 1997. Anatomia dos ovários e corpos adiposos de *Scinax fuscovaria* (Anura, Hylidae). *Acta Biologica Leopoldensia*, São Leopoldo. 19-22: 173-183.
- Pereira, G. 2014. *Biología reproductiva, movimientos y uso de microhábitat en Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) de Uruguay. MSc. Tesis. PEDECIBA. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 140 pp.
- Pereira, G., Abadie, M. & Maneyro, R. 2015. Reproductive pattern and dynamics of fat bodies in males of a Uruguayan population of *Physalaemus riograndensis* (Anura, Leptodactylidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 50: 213-220.
- 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. & Maneyro, R. 2017. Reproductive biology of *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) from Uruguay: reproductive effort, fecundity, sex ratio and sexual size dimorphism. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 12 pp.

Prado, C. P. A. & Haddad, C. F. B. 2005. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, South-Western Brazil. *Herpetological Journal*. 15: 181-189.

Prado, C. P. A., Uetanabaro, M. & Haddad, C. F. B. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia – Reptilia*. 26: 211-221.

Pyron, R. A. & Wiens, J. J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 543-583.

R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Version 3.2.5 (2016-04-14). 3475 pp. R Foundation for Statistical Computing. URL <https://www.R-project.org/>.

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.

Roff, D. A. 2002. *Life History Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland. 527 pp.

Schmidt, K. P. 1944. New frog from Misiones and Uruguay. *Publication. Field Museum of Natural History, Chicago, U. S. A.* 29: 153-160.

Segalla, M. V. & Langone, J. A. 2004. Anfíbios. *In*: Mikich, S. B. & Bérnils, R. S. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná*. 539-577 pp.

Shine, A. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*. 1979: 297-306.

StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

Stebbins, R. C. & Cohen, N. W. 1997. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 316 pp.

Valdez, V. & Maneyro, R. 2016. Reproductive biology of *Odontophrynus americanus* females (Duméril & Bibron, 1841) (Anura, Cycloramphidae) from Uruguay. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 11: 188-197.

Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Third Edition. Burlington, Massachusetts, U.S.A.: Academic Press.

Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*. 25: 666-693.

Wells, K. D. 2007. *The ecology and behaviour of amphibians*. University of Chicago Press, Chicago, IL. 1148 pp.

Winck, G. R., Maragno, F. P. & Cechin, S. Z. 2006. Notes on geographic distribution. Amphibia, Anura, Leptodactylidae, *Limnomedusa macroglossa*: distribution extension in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Check List*. 2: 53-54.

Winter, B. 2013. Linear models and linear mixed effects models in R with linguistic applications. Disponible en: <http://arxiv.org/pdf/1308.5499.pdf>

Woolbright, L. L. 1983. Sexual selection and size dimorphism in anuran Amphibia. *The American Naturalist*. 121: 110-119.

Zank, C., Di-Bernardo, M., Maneyro, R., Colombo, P., Fusinatto, L. A. & 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.

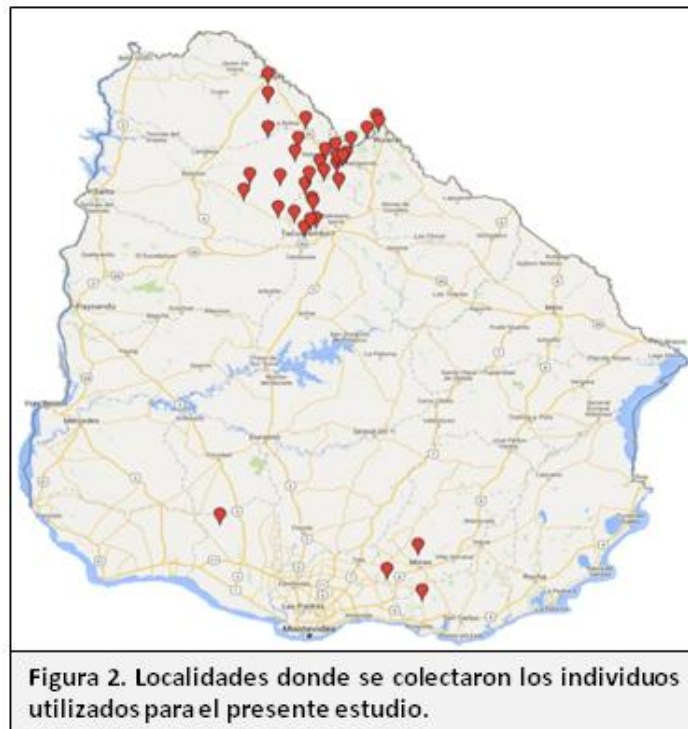
Zuur, A. F., Ieno, E. N. Walker, N., Saveliev, A. & Smith, G. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New York. 574 pp.

Zuur, A. F., Ieno, E. N. & Elphick, C. S. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*. 1: 3-14.

10 FIGURAS



Figura 1. Imagen de campo tomada en el Departamento de Tacuarembó donde se encontraron dos individuos de *Limnomedusa macroglossa* que se encontraban refugiados bajo una gran piedra.



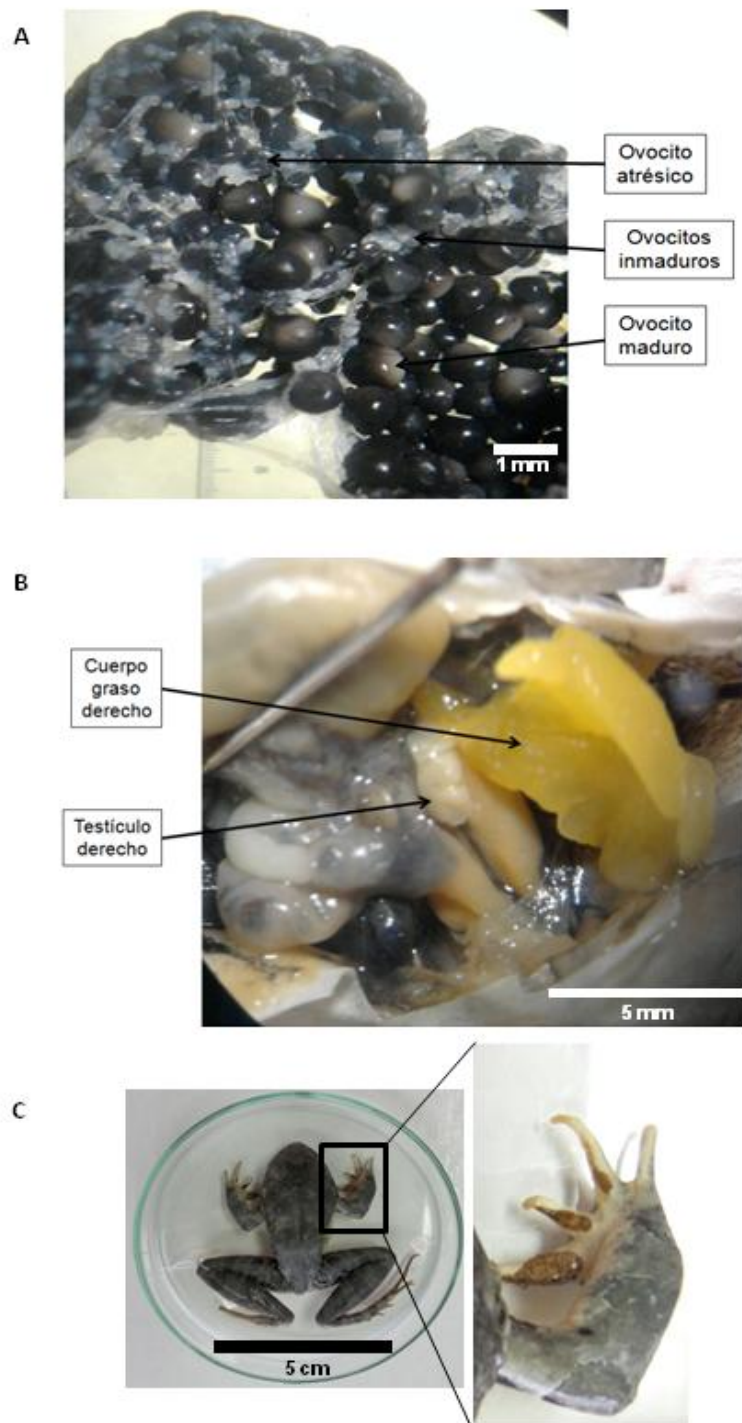


Figura 3. (A) Ovarios conteniendo ovocitos inmaduros, maduros y atrésicos; **(B)** Cavidad abdominal de macho juvenil señalando cuerpos grasos y testículo derecho; **(C)** Callos nupciales en machos adultos.

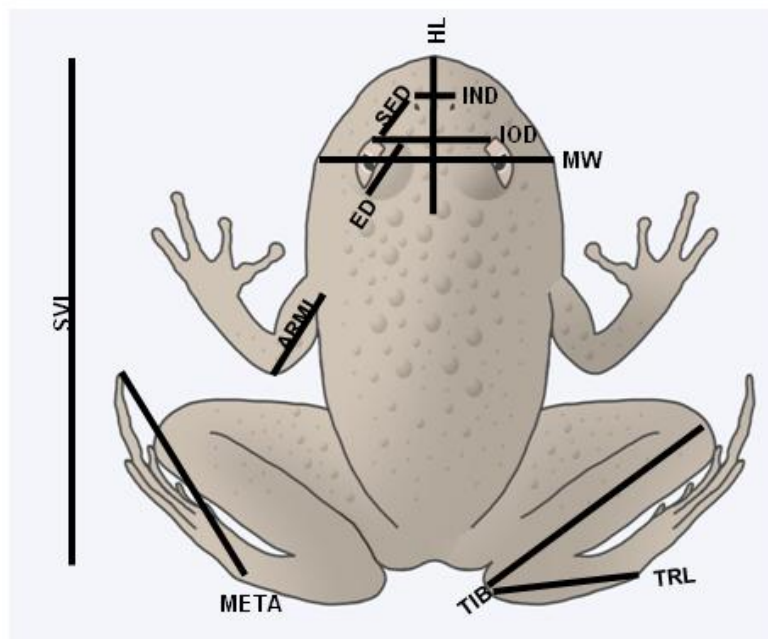


Figura 4. Variables morfológicas: largo hocico-cloaca = SVL; ancho mandibular = MW; largo de la cabeza = HL; distancia interorbital = IOD; diámetro del ojo = ED; distancia internarinas = IND; distancia ojo – narina = SED; largo del brazo = ARML; largo de la tibia = TIB; largo del tarso = TRL; largo del metatarso = META.

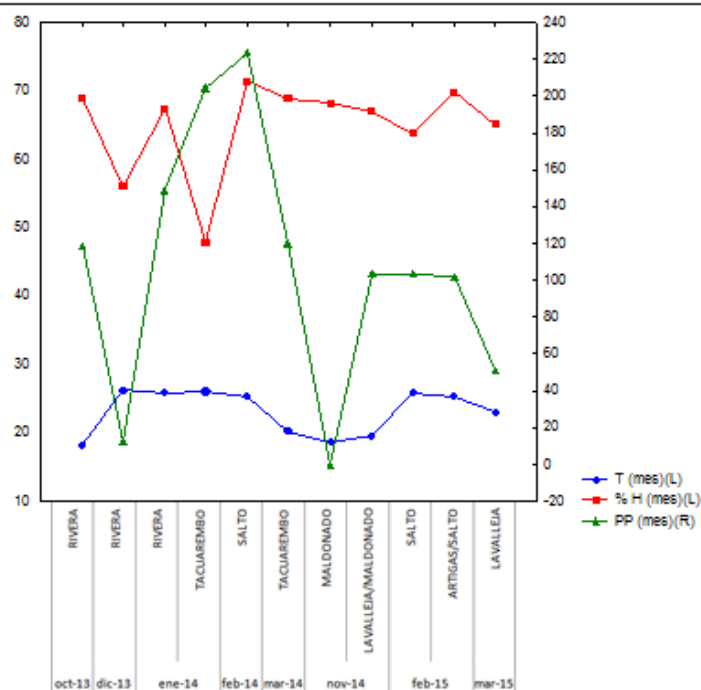
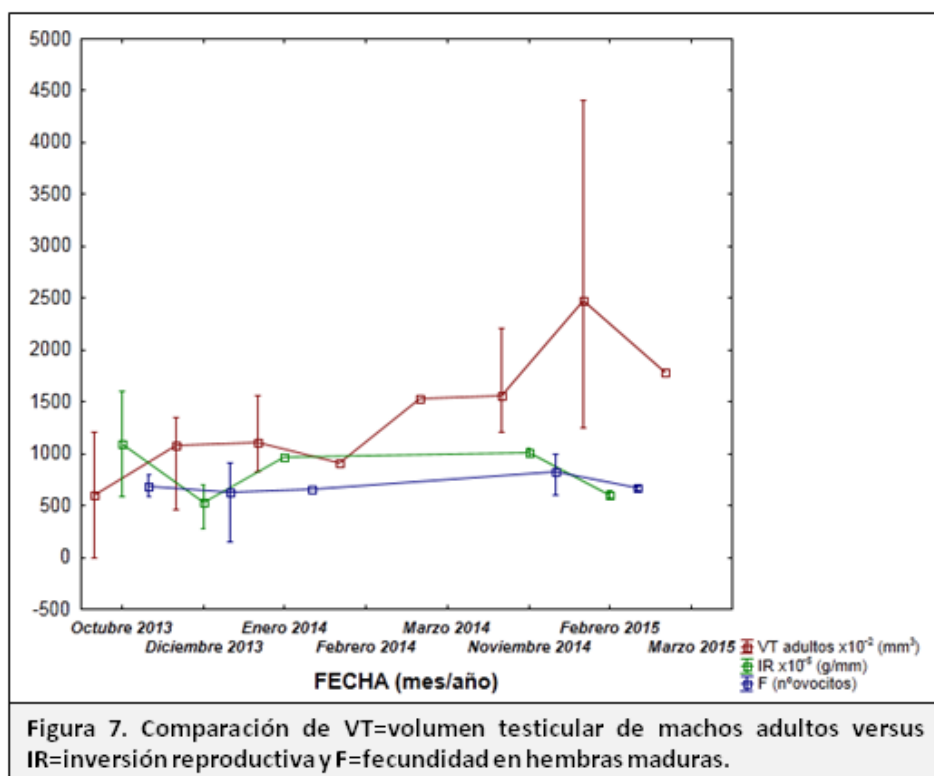
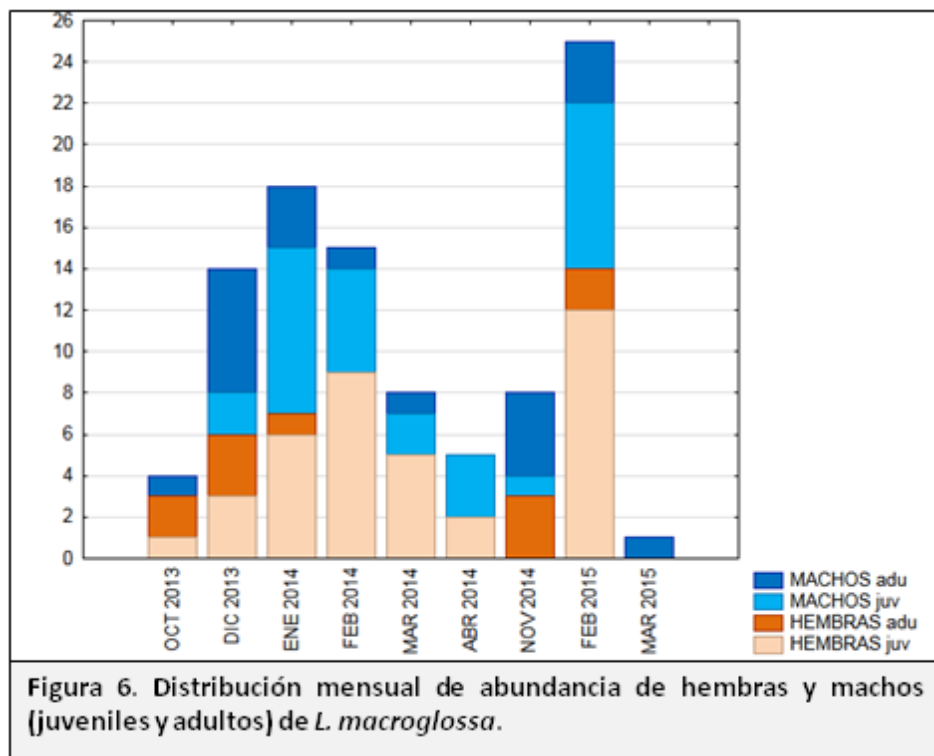


Figura 5. Datos de los factores abióticos por fecha y localidad: T(mes)=temperatura mensual en °C; %H(mes)=porcentaje de humedad mensual; PP(mes)=precipitaciones mensuales en mm (Datos obtenidos de INUMET e INE).



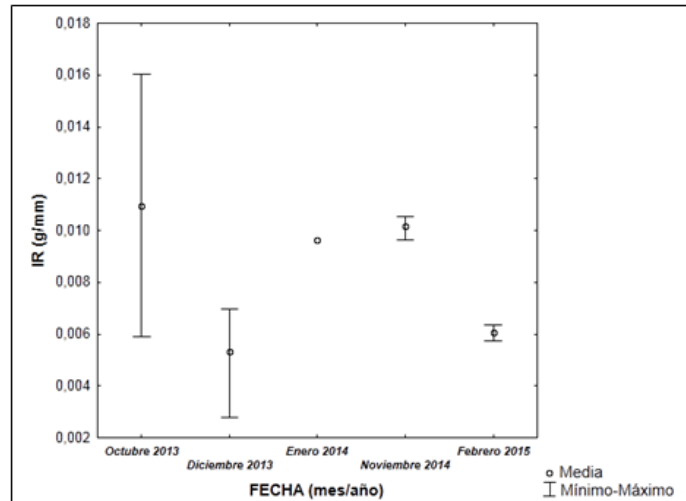


Figura 8. Análisis de la variación mensual de IR=Inversión reproductiva en hembras maduras de *Limnomedusa macroglossa*. Los puntos representan la media y las barras muestran los valores mínimos y máximos alcanzados.

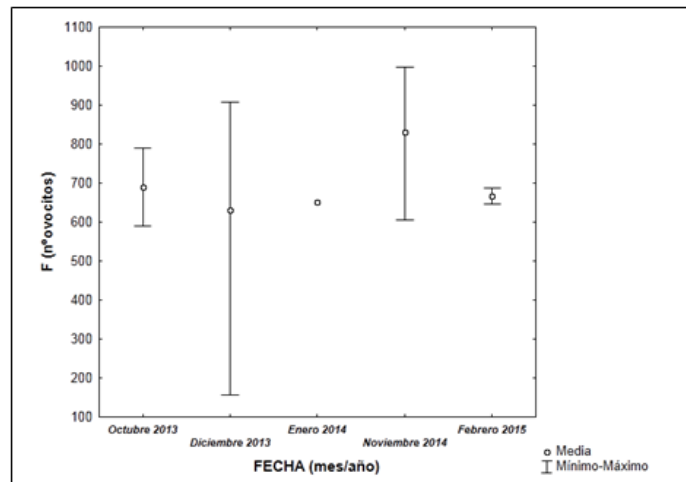


Figura 9. Análisis de la variación mensual de F=fecundidad en hembras maduras de *Limnomedusa macroglossa*. Los puntos representan la media y las barras los mínimos y máximos obtenidos.

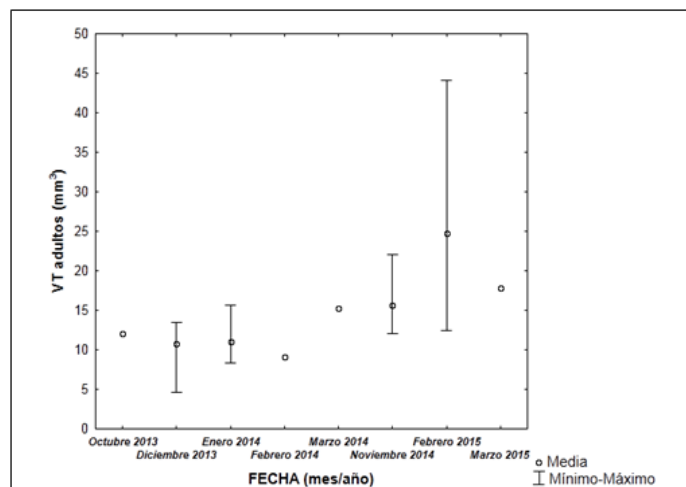
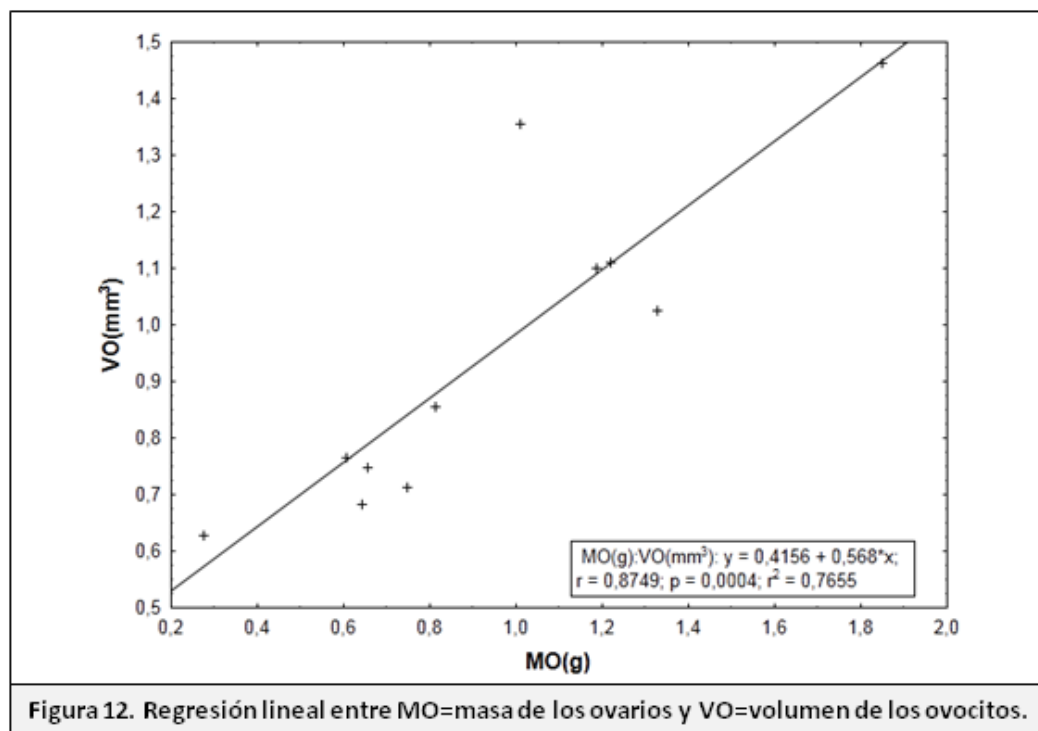
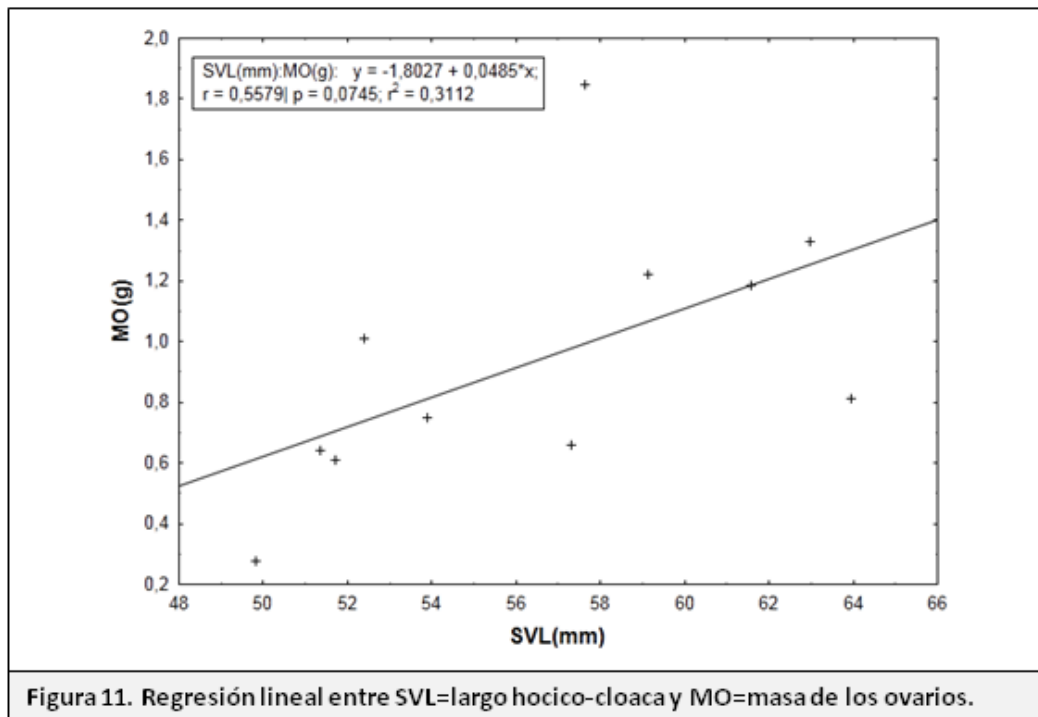


Figura 10. Análisis de la variación mensual del VT=volumen testicular, en aquellos individuos que se consideraron adultos, ya que presentaban callos nupciales. Los puntos representan la media, las barras los mínimos y máximos obtenidos.



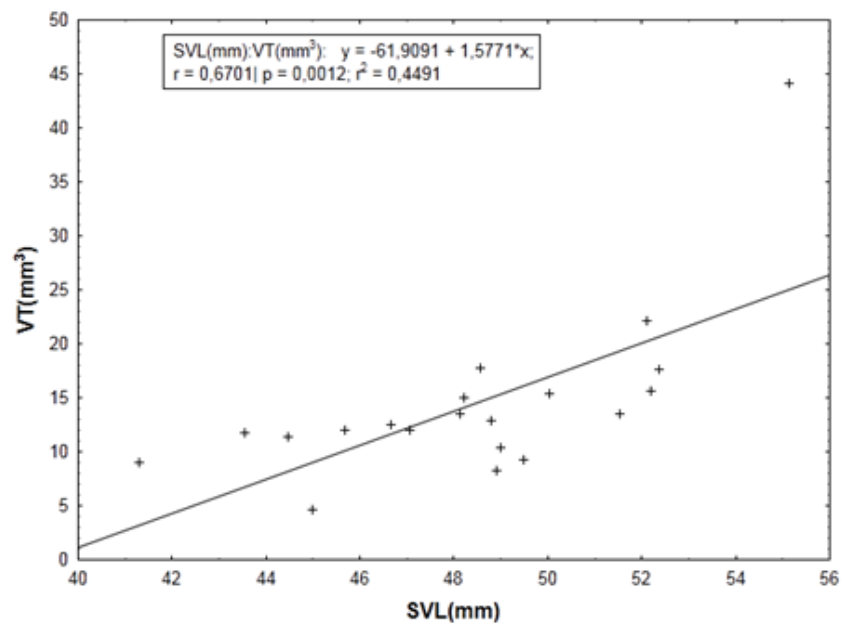


Figura 13. Regresión lineal entre SVL=largo hocico-cloaca y VT=volumen testicular en machos adultos.

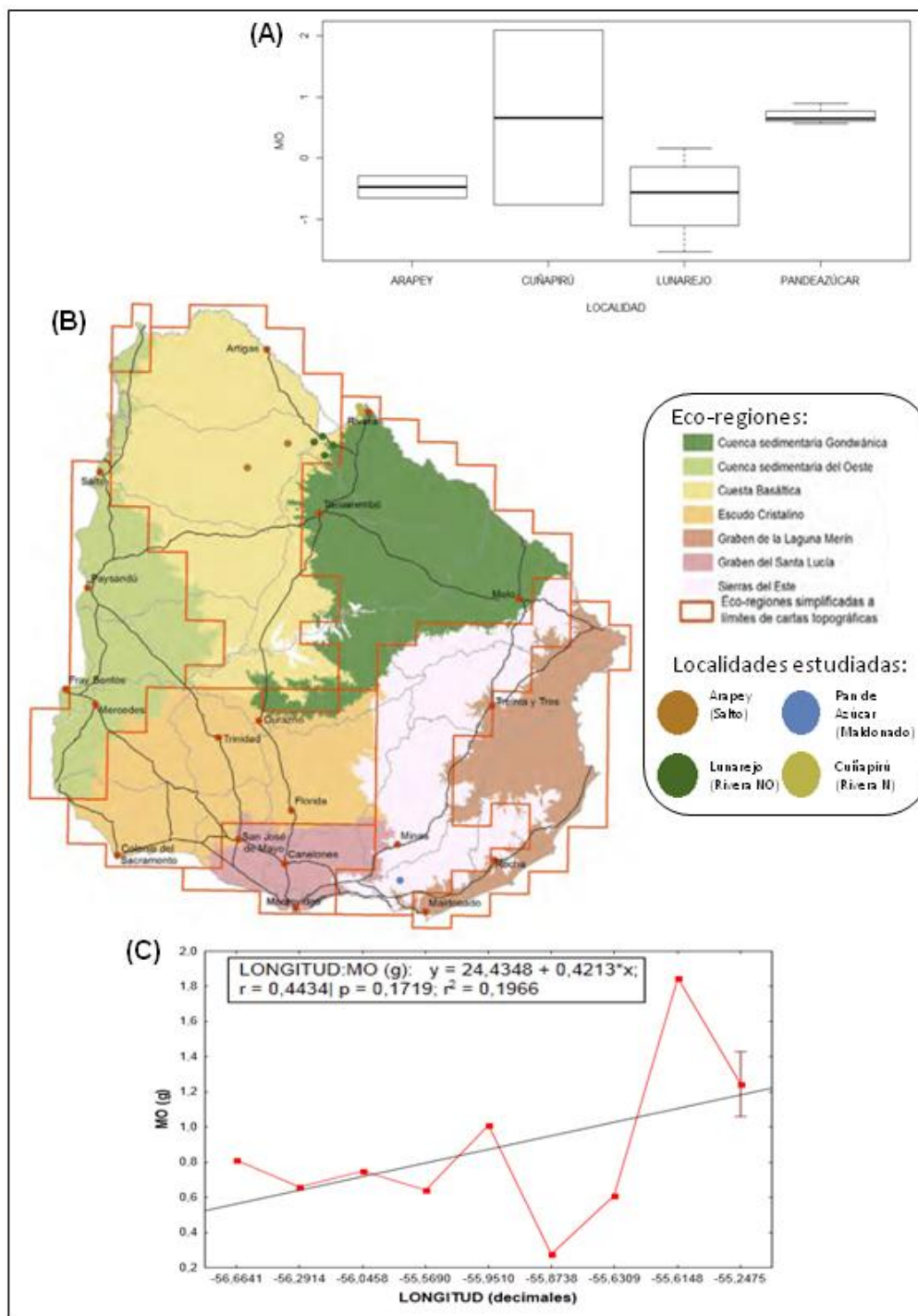
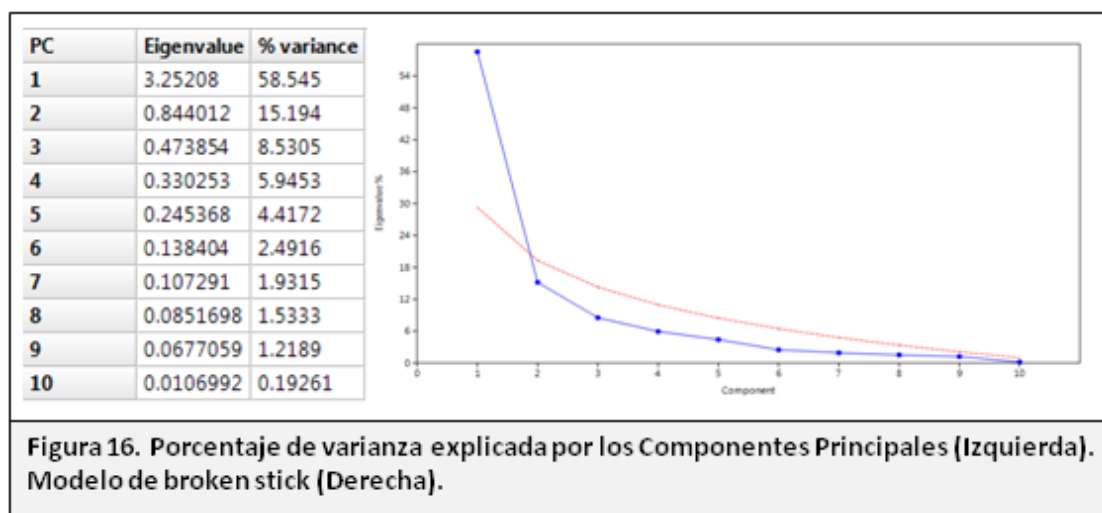
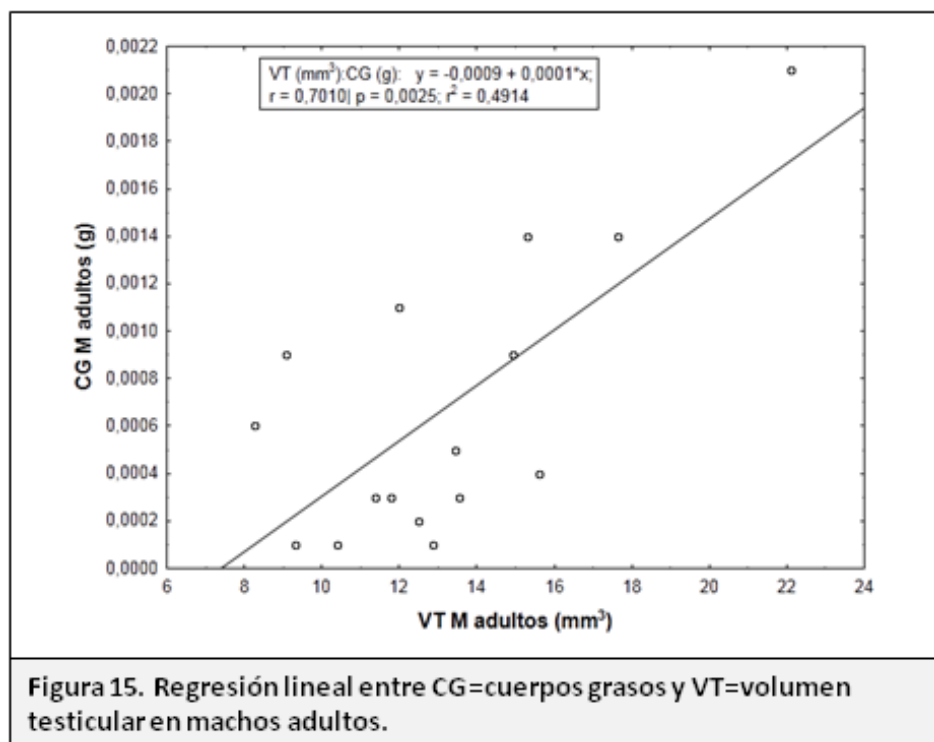
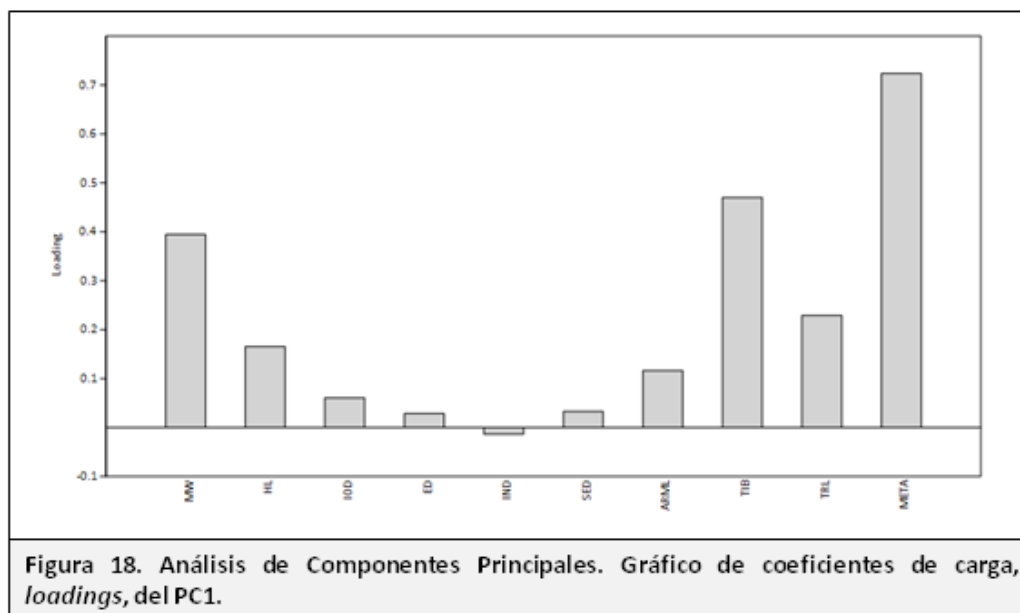
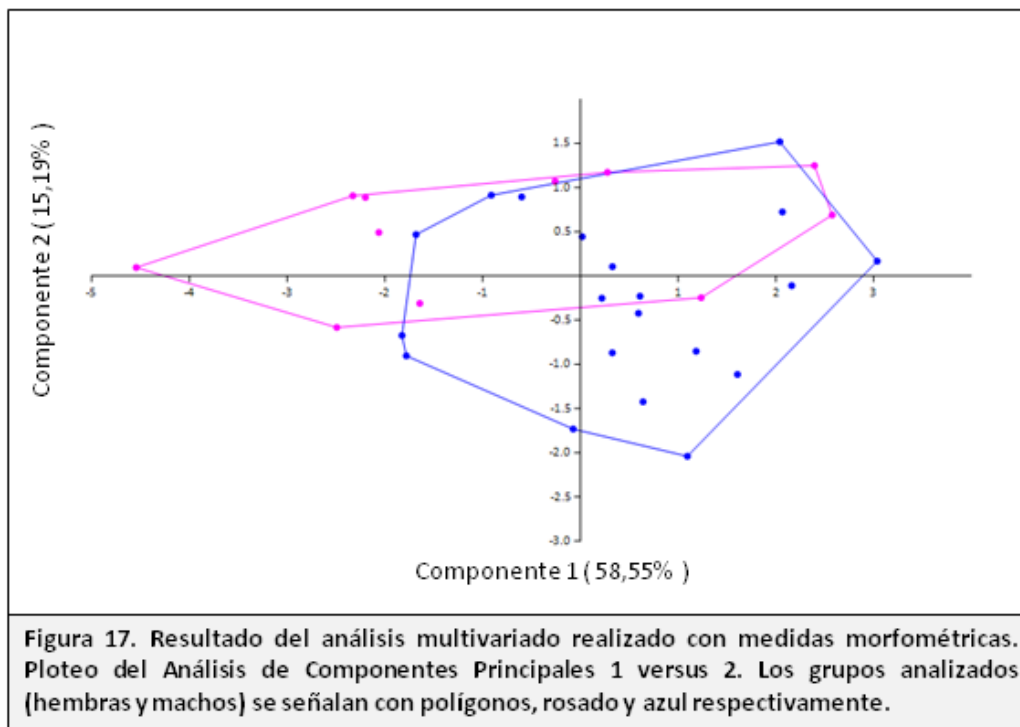


Figura 14. (A) Box-plot entre la variable aleatoria LOCALIDAD y la variable respuesta MO(g)=masa de los ovarios. Las localidades (de izquierda a derecha) corresponden a los Departamentos de: Salto, Rivera norte, Rivera noroeste y Maldonado, respectivamente; (B) Mapa de Uruguay señalando la delimitación de las eco-regiones. Las localidades señaladas (de izquierda a derecha) corresponden a los Departamentos de: Salto (2), Rivera noroeste (4), Rivera norte (2) y Maldonado (1), respectivamente (Modificado de Brazeiro, 2015); (C) Regresión lineal entre la coordenada geográfica Longitud (decimales) y la variable respuesta MO(g)=masa de los ovarios. Las coordenadas (ordenadas de izquierda a derecha) corresponden a las localidades estudiadas en los Departamentos de: Salto (2), Rivera noroeste (4), Rivera norte (2) y Maldonado (1), respectivamente.





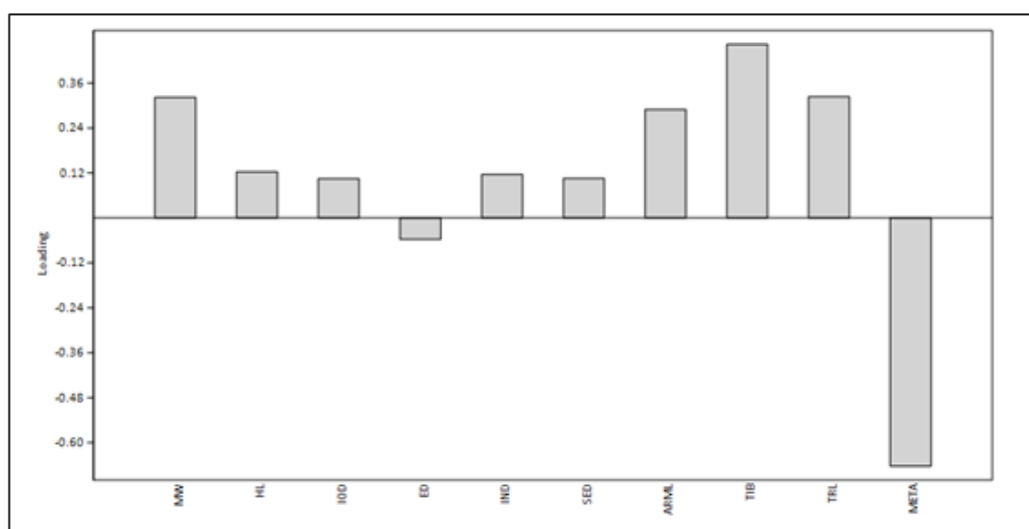


Figura 19. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de coeficientes de carga, *loadings*, del PC2.

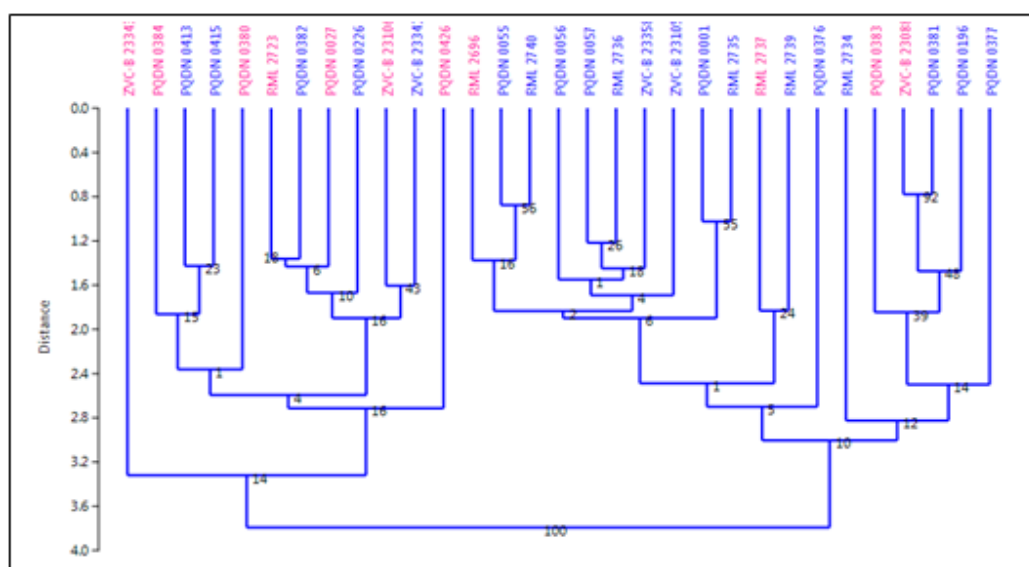


Figura 20. Resultado del análisis multivariado. Dendrograma de análisis de clúster jerárquico. Los números obtenidos son los porcentajes para 1000 pseudorréplicas.

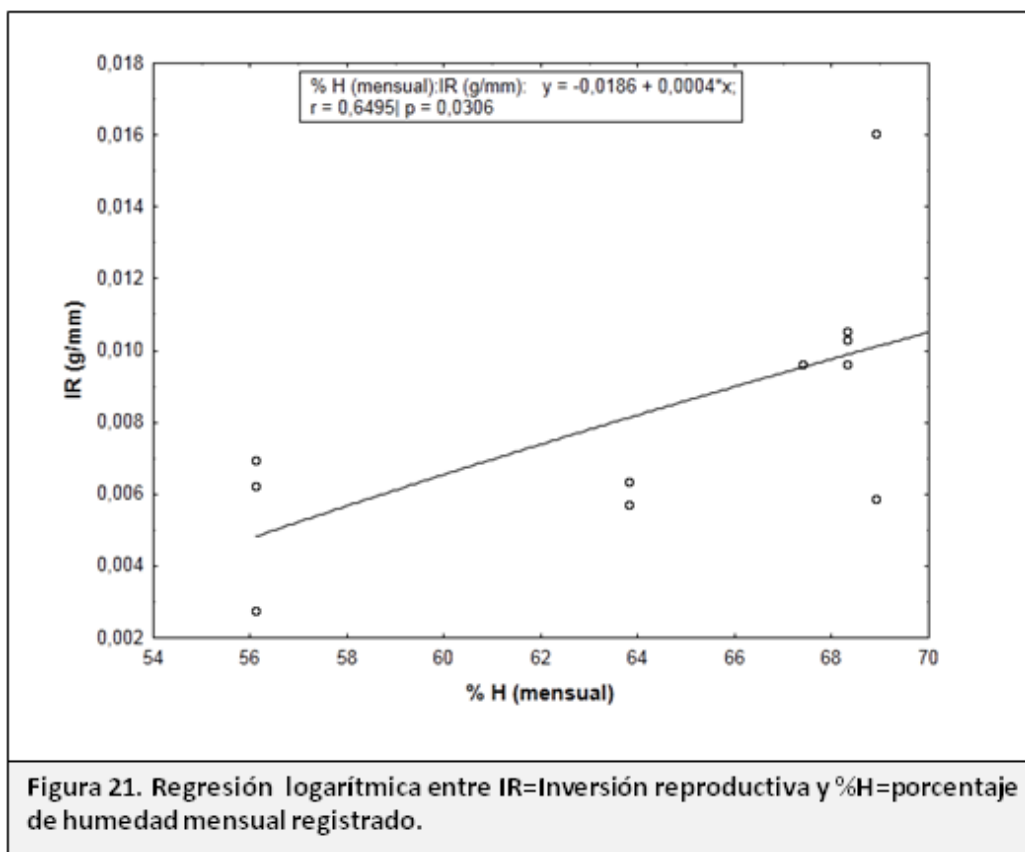


Figura 21. Regresión logarítmica entre IR=Inversión reproductiva y %H=porcentaje de humedad mensual registrado.

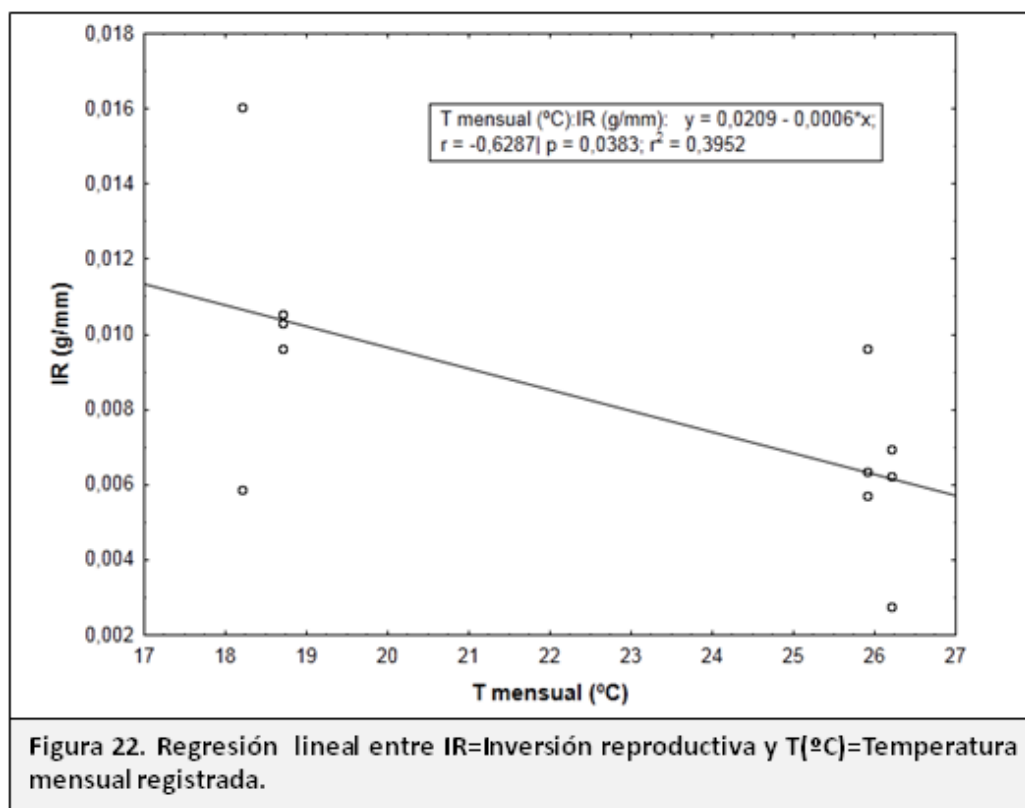


Figura 22. Regresión lineal entre IR=Inversión reproductiva y T[°C]=Temperatura mensual registrada.

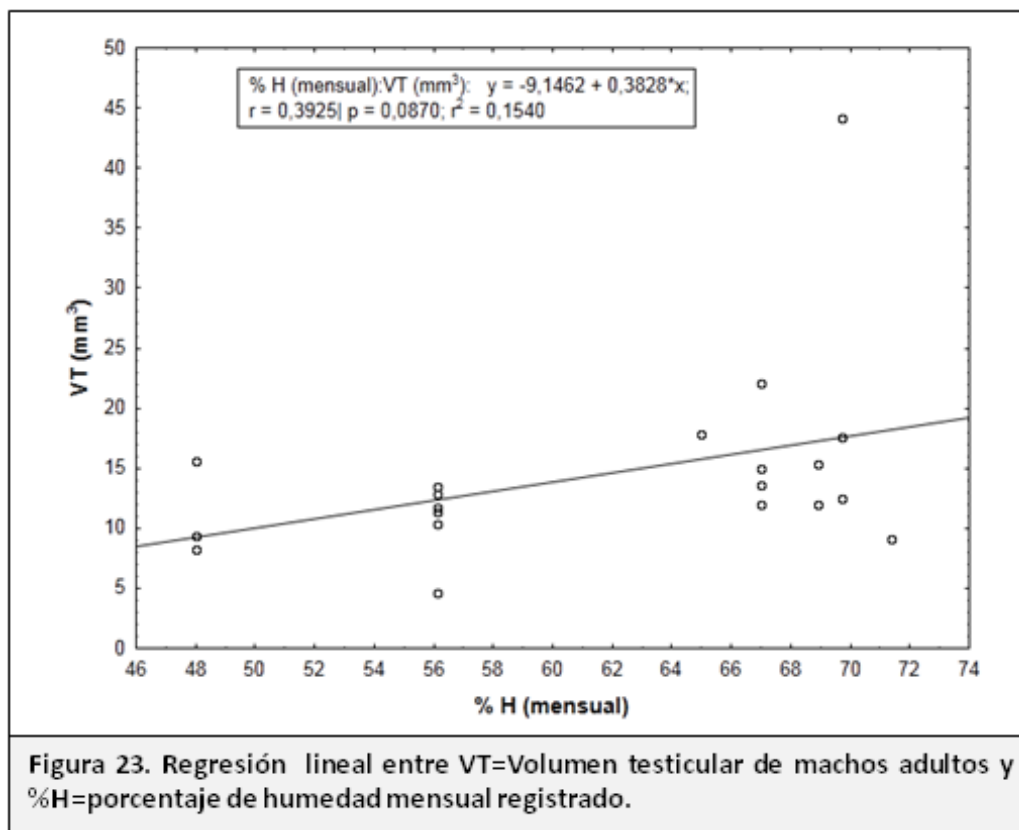


Figura 23. Regresión lineal entre VT=Volumen testicular de machos adultos y %H=porcentaje de humedad mensual registrado.

11 TABLAS

Tabla 1. Valores obtenidos de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) para todos los modelos diseñados.

TABLA 1: VALORES DE REML SEGÚN MODELO	
MO ~ 1 + (1 LOCALIDAD)	30,2
MO ~ SVL + (1 LOCALIDAD)	26,9
Mod (0): MO ~ 1 + (1 + SVL LOCALIDAD)	24,2
Mod (1): MO ~ SVL + (1 + SVL LOCALIDAD)	19,9
Mod (2): MO ~ SVL + CG + DIG + (1 + SVL LOCALIDAD)	16,3

Tabla 2. Resultado del Análisis de Varianza (ANOVA) realizado entre los modelos que mejor se adaptaron al set de datos. Los valores significativos se muestran en negrita y se señala el código del nivel de significancia obtenido.

TABLA 2: MODELOS DE EFECTOS MIXTOS									
Mod (0):	MO ~ 1 + (1 + SVL LOCALIDAD)								
Mod (1):	MO ~ SVL + (1 + SVL LOCALIDAD)								
Mod (2):	MO ~ SVL + CG + DIG + (1 + SVL LOCALIDAD)								
	DF	AIC	BIC	LOGLIK	DESVÍO	CHISQ	CHI	DF	PR(>CHISQ)
Mod (0):	5	32,195	34,184	-11,097	22,194				
Mod (1):	6	30,247	32,634	-9,123	18,246	3,948		1	0,0469 *
Mod (2):	8	29,255	32,439	-6,627	13,255	4,991		2	0,0824 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla 3. Resumen del análisis de regresión lineal múltiple realizado en hembras maduras. La variable dependiente utilizada fue la inversión reproductiva (IR), mientras que las independientes fueron la masa de los cuerpos grasos (CG) y el volumen ocupado por el tracto digestivo (DIG). Los valores significativos se muestran en negrita.

TABLA 3	b*	Std.Err.	b	Std.Err.	t(8)	p-value
Intercept			-0,00329335	0,00120983	-2,72215788	0,02616123
CG	-0,92198552	0,22035163	-0,02145741	0,00512825	-4,18415563	0,00306215
DIG	0,68554858	0,22035163	0,00095333	0,00030642	3,11115727	0,01442023

b y b* = coeficientes de regresión (Beta coef.)

Tabla 4. Resumen del análisis de regresión lineal múltiple realizado en machos adultos. La variable dependiente utilizada fue el volumen testicular (VT), mientras que las independientes fueron la masa de los cuerpos grasos (CG) y el volumen ocupado por el tracto digestivo (DIG). Los valores significativos se muestran en negrita.

TABLA 4	b*	Std.Err.	b	Std.Err.	t(16)	p-value
Intercept			1,841	1,4916	1,23415	0,234968
DIG	0,041633	0,091307	0,202	0,4426	0,45597	0,654539
CG	0,931060	0,091307	3136,112	307,5502	10,19707	0,000000

b y b* = coeficientes de regresión (Beta coef.)