

ra  
COMPARACIÓN DEL TAMAÑO MÍNIMO DE LA MADUREZ SEXUAL Y DE LA  
POSTURA DE *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* (ANURA:  
STRABOMANTIDAE) DISTRIBUIDAS EN LOS DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y  
CAUCA.

RODRIGO MUÑOZ ARCOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2018

COMPARACIÓN DEL TAMAÑO MÍNIMO DE LA MADUREZ SEXUAL Y DE LA  
POSTURA DE *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* (ANURA:  
STRABOMANTIDAE) DISTRIBUIDAS EN LOS DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y  
CAUCA.

PRESENTADO POR:  
RODRIGO MUÑOZ ARCOS

ASEROR:  
BELISARIO CEPEDA QUILINDO  
Maestría en Ciencias biológicas

CO-ASESOR  
MARVIN ANGANÓY CRIOLLO  
Maestría en Ciencias biológicas

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo  
Modalidad Trabajo de investigación

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2018

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

Director

Belisario Cepeda Quilindo, MSc

---

Co-director

Marvin Anganoy Criollo, MSc

---

Jurado

Jesús Eduardo Ortega, PhD (c)

---

Jurado

Jonh Jairo Mueses, MSc

---

San Juan de Pasto, 30 de Abril del 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme estar aquí compartiendo mis metas y por permitirme alcanzar uno más de mis sueños.

A mi Familia por su apoyo incondicional y comprensión que hizo posible culminar esta etapa de mi vida.

Al Grupo de Investigación de Biología de Paramos y Ecosistemas Andinos, liderado por la Doctora María Elena Solarte por el acceso al material colectado.

A mi asesor, El Profesor Belisario Cepeda Quilindo por sus enseñanzas, acompañamiento, sugerencias y paciencia en el desarrollo de la investigación. Por ser parte de mi formación como Biólogo.

A Marvin Anganoy Criollo por estar atento en la formulación y ejecución de este trabajo y por sus sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A mis Jurados, el Estudiante de Doctorado Jesús Eduardo Ortega y el Magister John Jairo Mueses, por sus valiosos aportes para la consolidación de este trabajo.

A mis profesores a largo de la carrera, los cuales transmitieron sus conocimientos con paciencia y disponibilidad.

A Jonny Santander por su apoyo incondicional y motivación y a todas aquellas personas que hicieron parte de nuestra formación como biólogos, por su apoyo, consejos y porque fue un honor compartir con ustedes tantos momentos.

Al laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander, a la PhD Martha Patricia Ramírez y al biólogo Ezequiel Gonzales León por su atención y colaboración en la realización de los cortes histológicos.

## **DEDICATORIA**

A mi madre Nelly María Arcos, por ser mi fuente de motivación e inspiración durante este recorrido, por su comprensión, cariño y entrega incondicional, porque sin su sacrificio y esfuerzo no hubiera alcanzado cada una de las metas que me he propuesto hasta el momento. Por tus palabras de aliento que no me dejaron decaer para que siguiera adelante y siempre cumpla mis ideales; por esto y más, no me alcanzara la vida para agradecerte y brindarte todo el amor que te mereces.

A mi padre José Arismendy Muñoz, por ser mi fuente de motivación e inspiración durante este recorrido, por los consejos sabios que en el momento exacto has sabido darme para no dejarme caer y enfrentar los momentos difíciles. Con tu ejemplo me has enseñado a vivir y a reír con el mundo, donde hemos compartido momentos felices. También te doy las gracias porque me has hecho crecer como persona, ayudándome a salir adelante para ser de mi lo que hoy soy y sobre todo gracias por el amor tan grande que me das.

A mis hermanos Emilse, Cristina, Marisol, David Esteban y Ricardo Andrés, Que con su apoyo, comprensión y afecto moral, estuvieron siempre conmigo en los momentos más difíciles de mi formación. Por eso les brindo mi gratitud de todo corazón por su apoyo incondicional que de alguna manera contribuyeron a terminar con mi carrera.

Rodrigo Muñoz Arcos

## RESUMEN

Se evaluó la variación del tamaño mínimo de madurez sexual y el tamaño de la postura en *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* pertenecientes a dos clados filogenéticos distintos del género *Pristimantis* que se encuentran distribuidas en los departamentos de Nariño y Cauca. El tamaño de la postura se determinó mediante el conteo de huevos, el diámetro de huevos y diámetro del oviducto de material depositado en la colección PSO-CZ de la Universidad de Nariño. El tamaño mínimo de la madurez sexual de los machos se determinó por la presencia o ausencia de etapas de espermatogénesis observados a través de cortes histológicos de testículos y para el caso de las hembras se determinó mediante la presencia y tamaño de folículos yemados y el tamaño del oviducto.

Para la comparación de los aspectos reproductivos entre el grupo *P. myersi* y *P. unistrigatus* se realizó una revisión rigurosa de bibliografía sobre los modos reproductivos de especies de desarrollo directo. El tamaño del cuerpo de las hembras de *P. myersi*, fue significativamente más grandes que los machos ( $t= 11.8$ ;  $p < 0.05$ ). De acuerdo con los resultados de las variables reproductivas, las hembras se clasificaron en juveniles con oviducto recto delgado y folículos no yemados; sub-adultas y maduras con oviducto convoluto, delgado y folículos yemados, y hembras adultas y maduras con oviducto convoluto grueso y folículos yemados, estas categorías fueron significativamente diferentes ( $H= 30.424$ ;  $p < 0.05$ ). Se encontró una correlación significativa entre el tamaño del cuerpo (LRC) y el diámetro de huevos ( $p$ -value 0.05 y  $R^2 = 0.44$ ), entre la LRC y el diámetro del oviducto ( $p$ -value 0.05 y  $R^2 = 0.65$ ), y entre LRC y el tamaño de la postura ( $p$ -value 0.005 y  $R^2 = 0.0021$ ). En machos adultos en etapa reproductiva se observaron todas las etapas de espermatogénesis, mientras que en los machos adultos aún no reproductivos (sub-adultos)

presentaron pocos cistos de espermátides tardías. Los aspectos reproductivos encontrados para las especies del grupo de *Pristimantis myersi* difieren del grupo de especie de *Pristimantis unistrigatus* principalmente en el tamaño de la postura. Se observó que los aspectos reproductivos de *P. myersi* y *P. unistrigatus* son similares a las ranas de desarrollo directo.

Palabras claves: Madurez sexual, Tamaño de postura, Cortes histológicos, *Pristimantis myersi*, *Pristimantis unistrigatus*.



## ABSTRACT

In this research evaluated the variation of the minimum size of sexual maturity and the size of the clutch in *Pristimantis myersi* and *Pristimantis unistrigatus* belonging to two clades phylogenetic different of the genus *Pristimantis* that are distributed in the departments of Nariño and Cauca. The size of the posture was determined by the counting of eggs, the diameter of eggs and diameter of the oviduct of material deposited in the collection PSO-CZ of the University of Nariño. The minimum size of sexual maturity in males was determined by the presence or absence of stages of spermatogenesis observed through histological sections of testes.

For the comparison of the reproductive aspects between the group *P. myersi* and *P. unistrigatus* conducted a rigorous review of the literature on the modes reproductive rights of species of direct development. The size of the body of the females of *P. myersi*, was significantly larger than males ( $t= 6.8$ ;  $p < 0.05$ ). According to the results of the reproductive variables, the females were classified in juveniles with thin straight oviduct and unyolks eggs; Sub-adult and mature with oviduct convoluted, thin and egg yolks and mature females with oviduct convoluted thick and egg yolks, these categories were significantly different ( $H= 30.42$ ;  $p < 0.05$ ). It was found a significant correlation between the size of the body (LRC) and diameter of eggs (p-value 0.05 and  $R^2 = 0.44$ ), between the LRC and diameter of the oviduct (p-value 0.05 and  $R^2 = 0.65$ ) and between LRC and size of the clutch (p-value 0.005 and  $R^2 = 0.0021$ ). In adult males in reproductive stage were observed all stages of spermatogenesis, whereas in adult males have not reproductive (sub-adults) presented few

cysts of late Spermatids. The reproductive aspects found for the species of the group of *Pristimantis myersi* differ from the group of species of *Pristimantis unistrigatus* principally in the size of the clutch. It was observed that the reproductive aspects of *P. myersi* and *P. unistrigatus* they are similar to the frogs of direct development.

Keywords: Sexual maturity, Size of clutch, histological sections, *Pristimantis myersi*, *Pristimantis unistrigatus*.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA .....</b>	<b>21</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>27</b>
3.1. <i>Anfibios</i> .....	27
3.2. <i>Historia de vida</i> .....	28
3.3. <i>Madurez sexual</i> .....	29
3.4. <i>Estrategias reproductivas</i> .....	30
3.5. <i>Modos reproductivos</i> .....	31
3.6. <i>Tamaño de la postura</i> .....	33
3.7. <i>Taxón Terrarana Brachycephaloidea</i> .....	34
3.8. <i>Pristimantis Jiménez de la Espada, 1871</i> .....	35
<b>4. ESTADO DEL ARTE .....</b>	<b>36</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
5.1. <i>Objetivo general</i> .....	39
5.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	39
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
6.1. <i>Pristimantis myersi (Goin and Cochran, 1963)</i> .....	40

6.2.	<i>Pristimantis unistrigatus</i> (Günther, 1859).....	41
6.3.	<i>Material examinado</i> .....	43
6.4.	<i>Trabajo en laboratorio</i> .....	46
6.5.	<i>Análisis histológico</i> .....	48
6.6.	<i>Análisis estadístico</i> .....	49
6.7.	<i>Comparación de los aspectos reproductivos de los grupos <i>Pristimantis myersi</i> y <i>Pristimantis unistrigatus</i></i> .....	50
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
7.1.	<i>Dimorfismo sexual en <i>Pristimantis myersi</i></i> .....	51
7.2.	<i>Descripción del aparato reproductor de <i>Pristimantis myersi</i></i> .....	53
7.2.1.	<i>Sistema reproductor femenino</i> .....	53
7.2.2.	<i>Sistema reproductor masculino</i> .....	55
7.3.	<i>Madurez sexual</i> .....	57
7.3.1.	<i>Determinación de madurez sexual en hembras de <i>Pristimantis myersi</i></i> .....	57
7.3.2.	<i>Variables reproductivas en hembras de <i>Pristimantis myersi</i></i> .....	59
7.3.3.	<i>Determinación de madurez sexual en machos de <i>Pristimantis myersi</i></i> .....	61
<b>8.</b>	<b>COMPARACIÓN DE LOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LOS GRUPOS <i>Pristimantis myersi</i> y <i>Pristimantis unistrigatus</i></b> .....	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>66</b>

9.1. <i>Dimorfismo sexual</i> .....	66
9.2. <i>Descripción del sistema reproductor</i> .....	67
9.3. <i>Madurez sexual</i> .....	69
10. <i>COMPARACIÓN DE LOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LOS GRUPOS</i>	
<i>Pristimantis myersi y Pristimantis unistrigatus</i> .....	72
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>73</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>74</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>89</b>

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Tabla 1. Localidades de muestreo; Puerres, Pasto, Tangua, El Tablón de Gomez y La Cruz (Nariño) y Bolívar (Cauca). .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 2. Localidades de muestreo; Km23, Reserva el Morar, Centro Ambiental Chimayoi y Granja experimental Botana. ....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 3. Tamaño y volumen de testículos durante la madurez sexual de <i>Pristimantis myersi</i>. .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 4. Comparación de aspectos reproductivos de <i>Pristimantis myersi</i> (grupo <i>P. myersi</i>) y <i>Pristimantis unistrigatus</i> (grupo <i>P. unistrigatus</i>).....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de *Pristimantis myersi* familia Craugastoridae. Tomado y modificado de Rojas-Runjaic & Guayasamin, 2015..... 41
- Figura 2.** Distribución de *Pristimantis unistrigatus* familia Craugastoridae para Colombia. Tomado y modificado de Acosta Galvis & Cuentas, 2017..... 42
- Figura 3.** Localización geográfica de las estaciones de muestreo en el transecto CHCT1. Complejo de páramos Chiles-Cumbal. Universidad de Nariño-Instituto Humboldt. Solarte et al., 2015..... 45
- Figura 4.** Longitud rostro–cloaca (en mm) entre hembras y machos de *Pristimantis myersi*. Los números dentro de la figura, representan el *N* de cada sexo. .... 52
- Figura 5.** Boca de *Pristimantis myersi*, donde se muestran las hendiduras vocales (círculo rojo), (L: lengua)..... 53
- Figura 6.** Aparato reproductor de una hembra de *Pristimantis myersi*. Cuerpos grasos (A), oviducto recto y masa de folículos cubierta de tegumento negro (B), oviducto recto y masa de folículos blanca (C), oviducto convoluto grueso y folículos pigmentados (D), (Cg: cuerpos grasos, Ov: oviductos, FNY: folículos no yemados y FY: folículos yemados). Las imágenes A y D corresponden a una hembra madura y las imágenes B y C corresponden a hembras inmaduras. .... 54
- Figura 7.** Folículos distribuidos en el cuerpo de una hembra adulta de *Pristimantis myersi*. Distribución de folículos en todo el abdomen, desde la vida ventral (A), folículos yemados y no yemados en forma racimosa (B), (FY: folículos yemados, FNY: folículos no yemados). .... 55

- Figura 8.** Aparato reproductor de un macho de *Pristimantis myersi*. Testículo de coloración opaca (blanca–negra) de macho sub–adulto o adulto (A), testículo de coloración oscura de macho adulto (B), cuerpos grasos (C), (T: testículo, Ls: lóculo seminífero, Cg: Cuerpos grasos)..... 56
- Figura 9.** Categorías de la madurez sexual de las hembras de *Pristimantis myersi* respecto al tamaño del cuerpo. LCR: Longitud rostro–cloaca. LCR: Longitud rostro–cloaca. (OCDFY: oviducto convoluto delgado y folículos yemados, OCGFY: oviducto convoluto grueso y folículos yemados, ORDFNY: oviducto recto delgado y folículos no yemados)..... 58
- Figura 10.** Regresión lineal entre la Longitud rostro-cloaca y diámetro de los huevos. .... 60
- Figura 11.** Regresión lineal entre la Longitud rostro-cloaca y diámetro del oviducto. .... 60
- Figura 12.** Regresión lineal entre la Longitud rostro cloaca y numero de folículos..... 61
- Figura 13.** Fotomicrografía obtenida de cortes de testículos de machos de *Pristimantis myersi*. Macho adulto en actividad reproductiva teñido con hematoxilina-eosina, Ta- túnica albugínea, Epg- Espermatogonia, Esp- espermatocitos, Esm- espermátidas, Lts- luz del túbulo seminífero.63
- Figura 14.** Fotomicrografía obtenida de cortes de testículos de machos de *Pristimantis myersi*. Machos adultos aún no reproductivos (no en temporada reproductiva) o macho sub-adulto teñido con hematoxilina-eosina, Esm- espermátidas, Ta- túnica albugínea, Ls- lóbulo..... 64



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tamaños mínimos y máximos (LRC) de las especies del grupo <i>Pristimantis myersi</i> ..	89
Anexo 2. Tamaños mínimos y máximos (LRC) de las especies del grupo <i>Pristimantis unistrigatus</i> .....	90
Anexo 3. Fotomicrografía obtenida de cortes de testículos de machos de <i>Pristimantis unistrigatus</i> . Macho adulto en actividad reproductiva.....	96

## GLOSARIO DE TERMINOS

**Historia de vida:** Incluyen cualquier patrón de proceso o comportamiento de vida que afectan la supervivencia, el crecimiento y la reproducción diferencial que pueden mejorar la probabilidad de éxito evolutivo de los organismos.

**Estrategias reproductivas:** Estrategias utilizadas por los Anuras (machos y hembras) para reproducirse durante varios meses o durante todo el año.

**Modos reproductivos:** Es un aspecto central en la historia de vida de los anfibios, que incluye: sitio de ovoposición, características de los huevos y las puestas, tipo y duración del desarrollo embrionario y larvario, tipo de cuidado parental.

**Tamaño de la postura:** Se define como el número promedio de huevos que una hembra oviposita por postura. El tamaño de la postura, que es una medida de la fecundidad, es una forma de medir el esfuerzo reproductivo instantáneo de una hembra

**Tamaño de madurez sexual:** Tamaño alcanzado por un individuo en el que su desarrollo orgánico le permite reproducirse y marca su forma adulta.

**Espermatogénesis:** Formación de células sexuales o gametas. Se realiza por medio de la meiosis, forma de reproducción sexual de organismos superiores.

**Ovogénesis:** Desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica que se lleva a cabo en los ovarios.

**Gónadas:** Órganos que se encargan principalmente de producir gametas (células sexuales), pero también secretan hormonas. Las gónadas femeninas son los ovarios y las masculinas los testículos.

## ABREVIACIONES

**LRC:** Longitud rostro-cloaca

♂: Machos

♀: Hembras

**PSO:** Pasto

**ORDHNY:** Oviducto recto delgado huevos no yemados

**OCDHY:** Oviducto convoluto delgado huevos yemados

**OCGHY:** Oviducto convoluto grueso huevos yemados

***P. unistrigatus:*** *Pristimantis unistrigatus*

***P. myersi:*** *Pristimantis myersi*

## 1. INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA

En el Neotropico se encuentran aproximadamente 7659 especies de todos los anfibios conocidos en el mundo (Anura (89%), Caudata (9%) y Gymnophiona (2%))(Frost, 2018; Hutter, Liu, Kell, Lyons, & Guayasamin, 2016). Uno de los grupos más diversos dentro de los anuros, son los conocidos como Eleutherodactilinos, superfamilia Brachycephaloidea Günther, 1858 (Familias: Craugastoridae, Strabomantidae, Eleutherodactylidae y Géneros: Strabomantis y Brachycephalus), que incluyen 1077 especies conocidas hasta el momento (Hedges, Duellman, & Heinicke, 2008; Padial, Grant, & Frost, 2014). Estas ranas se reproducen por fuera del agua, con posturas en tierra y presentan desarrollo directo, sus etapas larvales se llevan a cabo dentro del huevo y no en cuerpos de agua (Heinicke, Duellman, & Hedges, Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal, 2007). Están distribuidas desde el sur de Arizona y el centro de Texas (EE.UU.), en Centroamérica, llegando hasta América del Sur (Frost, 2018). Su amplia distribución y modo de reproducción ofrecen posibilidades para resolver preguntas de su evolución, ecología y conservación; sin embargo el progreso en todos estos campos ha sido obstaculizado por una pobre comprensión de sus relaciones evolutivas (Heinicke *et al.*, 2007; Padial *et al.*, 2014; Pyron & Wiens, 2011).

Dentro de los Eleutherodactilinos, se incluye el género *Pristimantis*, uno de los grupos más diversos en el mundo con 505 especies (Frost, 2018), y en Colombia con 213 especies reportadas hasta el momento (Acosta Galvis, 2017), distribuidas en todo el país (excepto en los desiertos y en los Llanos Orientales), ocupando una amplia variedad de climas y ecosistemas (Yáñez Muñoz & Bejarano Muñoz, 2013). Entre las ventajas que presentan los individuos pertenecientes a este

género, está la reproducción por desarrollo directo, estrategia de historia de vida que presumiblemente ha conducido a extensas radiaciones evolutivas, ya que las especies son capaces de colonizar hábitats distantes de agua en movimiento o estancada, lo cual representa una adaptación evolutiva que impulsó su especiación, influenciada por las transformaciones climáticas y geográficas (Reyes-Puig, Yáñez Muñoz, Cisneros Heredi, & Ramírez, 2010; Yáñez Muñoz & Bejarano Muñoz, 2013).

Por otro lado, las especies de este género presentan una variedad en los tamaños corporales en su estado de madurez sexual, característica que se ve influenciada por las condiciones ambientales de sus hábitats naturales que determinan el tamaño y número de posturas (Morrison & Hero, 2003). Variables ambientales como la temperatura, humedad y precipitación, influyen en la disponibilidad de recursos, los cuales son esencial es para que estas especies tengan una tasa de crecimiento y desarrollo rápido y así poder entrar en etapa reproductiva y generar varias posturas por año o una sola durante todo el año, dependiendo de los requerimientos energéticos acumulados por las hembras (Morrison & Hero, 2003). Camargo, Sarroca, & Maneyro (2008), en su trabajo sobre esfuerzo reproductivo y número de huevos vs cambio de tamaño en las ranas de *Physalaemus* determinan que individuos que depositan huevos de menor tamaño se asocian con una eclosión más rápida y menor tamaño de madurez sexual, otorgando una ventaja en relación a las especies que colocan huevos de tamaños grandes, debido a que su estado de madurez llega en menor tiempo (Elgue, 2013; Camargo, Naya, Canavero, da Rosa, & Maneyro, 2005). La ventaja que presentan las especies de alcanzar la madurez sexual con un menor tamaño está asociada con el tiempo de reproducción el cual llega más rápido con respecto a las especies grandes que

necesitan equilibrar su reservas energéticas en crecimiento para alcanzar una talla adecuada y así poder efectuar su reproducción (Camargo *et al.*, 2008).

En las tierras alto andinas de Nariño, el género *Pristimantis* es el ensamble de anuros más diverso, con aproximadamente 38 especies registradas (Acosta Galvis, 2017). Entre estas especies se encuentran *Pristimantis myersi* (Goin and Cochran, 1963) y *Pristimantis unistrigatus* (Günther, 1859), las cuales, aunque pertenecen al mismo género, son de clados distintos, por un lado *P. myersi* está dentro del grupo *Pristimantis myersi* y *P. unistrigatus* está dentro del grupo *Pristimantis unistrigatus* (Lynch & Duellman, 1997; Hedges *et al.*, 2008; Padialet *et al.*, 2014) y exhiben notables diferencias en su morfología (Lynch, 1981). Además, los hábitats que ocupan son totalmente diferentes, puesto que *P. myersi* habita principalmente en bosques andinos no intervenidos y *P. unistrigatus* está asociada a áreas abiertas adicionalmente presentan distribuciones altitudinales distintas (*P. myersi* entre 2900 - 3275 m y *P. unistrigatus* entre 2000 - 3200 m), aunque presentan un solapamiento altitudinal en los 2900 a 3000 m, lo cual posiblemente determinaron las marcadas diferencias morfológicas así como también el tamaño en su etapa adulta, además de sus características fisiológicas (tegumento, respuestas a temperatura, ganancia y pérdida de agua)(Lynch, 1981; Heinicke *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Yáñez Muñoz & Bejarano Muñoz, 2013).

La mayoría de estudios sobre biología reproductiva de anuros, han categorizado en especies de tallas grandes (> 25 mm) y distribuidas en centro América. Estudios realizados por Camargo *et al.* (2005) en poblaciones de *Physalaemus gracilis* en Uruguay, y por Rodrigues, Uetanabaro, & Lopes(2004) en poblaciones de *Eupemphix nattereri* en el estado de Mata Grosso Brasil

reportan que las hembras adultas con mayor tamaño son las que tienen mayor éxito reproductivo, ya que pueden alojar más cantidad de ovocitos (Valdez, 2012); sin embargo, en especies de tallas pequeñas como *Elachistocleis bicolor* el desarrollo reproductivo llega más rápido, una ventaja al momento de efectuarse la reproducción (Perotti, 1997).

Hasta el momento el conocimiento sobre la biología reproductiva de *P. myersi* es escaso y para *P. unistrigatus* existen datos de la histología del ovario (del Pino, 1997) no obstante está en curso una investigación que incluye la evaluación de las características de su historia de vida (Cepeda-Quilindo. Comunicación personal).

En atención a los anteriores argumentos, en el presente trabajo, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo varía el tamaño mínimo de madurez sexual y tamaño de la postura en *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus*, pertenecientes a dos clados filogenéticos distintos, y que se encuentran distribuidas en los Departamentos de Nariño y Cauca?



## 2. JUSTIFICACIÓN

Las características reproductivas juegan un papel fundamental en la historia de vida de las especies, la ecología y la dinámica de las poblaciones. Estas características son importantes al momento de conocer algunos aspectos de desarrollo, crecimiento y reproducción (Begon, Townsend, & Harper, 2005), aportando un sin número de información al momento de conocer el comportamiento de una especie; frente a condiciones ambientales que se presenten en las zonas donde se lleva a cabo el éxito de supervivencia y desarrollo de esa especie en particular. Esta información es valiosa al momento de tomar decisiones de manejo de las especies y sus hábitats, frente al nuevo escenario de cambios ambientales que sufre el planeta (Mueses Cisneros, 2005; López Noguera, 2015).

En la actualidad, los estudios de la biología reproductiva en anfibios se enfocan principalmente en el conocimiento de aspectos ecológicos (estructura) (Rincón Franco & Castro Herrera, 1998) y de los modos reproductivos (Crump, 1974), dejando a un lado la evaluación de las variables anatómicas y morfológicas con las cuales se puede determinar el estado de madurez sexual de un individuo que entra en una etapa reproductiva (Carezzano, Dorflinger, Alonso, & Urquiza Bardone, 2015; Sanz Ochotorena, Rodríguez Gómez, Segura Valdez, Lara Martínez, & Jiménez García, 2014). La mayoría de estudios sobre la biología reproductiva se han desarrollado principalmente en Centro América y el Caribe (Crump, 1974; Duellman, 1988; Lima & Keller, 2003; Bertoluci & Rodrigues, 2002; Haddad & Prado, 2005; Donnelly, 1999; Watling & Donnelly, 2002). En Colombia se han publicado algunos trabajos sobre patrones de

reproducción en anuros, como es el caso de Ortega, Serrano, & Ramírez Pinilla(2005)en una población de *Eleutherodactylus johnstonei*; en Bucaramanga, Arroyo Serrano Cardozo, & Ramírez Pinilla (2008)en un ensamble de *Pristimantis*; en Bucaramanga, Valderrama Vernaza, Serrano Cardozo, & Ramírez Pinilla(2010) en una población de *Ranitomeya virolinensis*; en Bucaramanga y Pacheco Florez & Ramírez Pinilla(2014) en una población de *Geobatrachus walkeri* de la Sierra Nevada de Santa Marta, los cuales se enfocan más en los modos reproductivos y madurez sexual de los individuos. No obstante, dada la diversidad de especies del género *Pristimantis*, esta información solo representa el conocimiento básico de la diversidad de la biología reproductiva de este grupo, lo cual no permite evaluar objetivamente la diversidad reproductiva de las especies, y poder entender cómo han evolucionado los modos reproductivos en especies de desarrollo directo pertenecientes a este género (Hedges *et al.*,2008; Padial *et al.*, 2014).

Por otro lado, en la mayoría de estas investigaciones siempre es necesario eutanizar los ejemplares, debido a que no se conoce en la actualidad una metodología que no implique manipulación directa y que no sea invasiva con los individuos, para conocer el estado de madurez sexual, lo que de alguna manera generan implicaciones bioéticas y alteraciones en la población de estudio (Zornosa Torres, 2011). Es por esto que se debe pensar en el aprovechamiento del material preservado en las colecciones zoológicas, que permita proporcionar conocimientos nuevos a partir de su morfología y anatomía, donde se puede conocer el estado de madurez sexual de ejemplares preservados por medio de cortes histológicos que evidencian los procesos de espermatogénesis y ovogénesis.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Anfibios

La clase Amphibia se divide en tres órdenes vivientes; Gymnophiona, Caudata y Anura (Lynch & Suárez Mayorga, 2002), donde el orden Anura es el más diverso entre los anfibios superando en la actualidad las 6744 especies vivientes conocidas (Frost, 2018).

Este grupo de vertebrados que se caracterizan por respirar a través de las branquias, pulmones y piel, estas dos últimas características lo constituyen como uno de los primeros grupos en ocupar con éxito el medio terrestre hace 360 millones de años (Duellman & Trueb, 1986; Zug, Vitt, & Caldwell, 2001), siendo el claro reflejo de un gran paso evolutivo de agua a tierra (Duellman & Trueb, 1986). Este grupo es considerado un componente crucial para los ecosistemas, debido a que cumplen importantes funciones dentro de los hábitats, pues hacen parte de las redes tróficas como depredadores y actúan como mecanismos de control biológico, aportando una biomasa muy significativa al flujo de energía (Rice, Mazzotti, Waddle, & Conill, 2006; Attademo, 2010).

Dentro de sus características morfológicas internas presentan un sistema reproductor el cual está unido al sistema urinario, debido a que las gónadas (testículos y ovarios) están ubicadas junto a los riñones (Duellman & Trueb, 1986; Carezzano *et al.*, 2013). Las hembras por ejemplo, presentan ovarios pareados de tamaño pequeño y compacto que se encuentran suspendidos por el mesovario en la parte media de los riñones que están conectados directamente con los oviductos

(Zornosa Torres, 2011; Carezzano *et al.*, 2013), en cuanto a los machos los testículos son pareados (Zug *et al.*, 2001), con forma esférica u ovalada y se unen a los riñones por medio de los conductos eferentes que van a dar al conducto de Wolff, el cual se expande formando la vesícula seminal que se observa como una región hinchada en forma de huso en estos conductos (Duellman & Trueb, 1986; Zug *et al.*, 2001; Carezzano *et al.*, 2015).

### **3.2. Historia de vida**

La historia de vida de los organismos comprenden patrones de crecimiento, diferenciación, almacenamiento y reproducción que están influenciados por condiciones de su entorno (clima y otros parámetros ambientales, relación con otras especies, etc.) presentes en las zonas donde habita cada organismo (Morrison & Hero, 2003; Begon *et al.*, 2005), esto también se enmarca dentro de rasgos coevolucionados que afectan la supervivencia y el potencial reproductivo, es decir, se presenta una variación de estos rasgos a nivel filogenético entre cada taxón, lo cual permite que estos patrones varíen entre individuos de una misma población de acuerdo a las condiciones ambientales (temperatura, humedad, precipitación entre otros) suministro de alimentos, depredación, competencia y genéticos (Crump, 2015). Las diferencias que se dan en estos patrones han generado una serie de implicaciones evolutivas como cambios en la morfología y fisiología presentando variantes anatómicas de forma y de peso que dependen del periodo reproductivo de una población (Duellman & Trueb, 1986; Zug *et al.*, 2001).

Otras características que se incluyen dentro de la historia de vida son dieta, estrategias de forrajeo, tamaño de madurez sexual, modo reproductivo, número de huevos por postura, uso del hábitat y horas de actividad, características que se usan para evaluar si los anfibios son más

susceptibles a los procesos de extinción (Morrison & Hero, 2003; Salgado Negret, 2015). Estas características asociadas a la variación, fecundidad y supervivencia a lo largo de la vida, además se puede predecir las estrategias vitales que han sido seleccionadas para maximizar la eficacia biológica de los organismos (Morales, 1988; Klemming, 2002), donde los modelos de optimización de estrategias vitales dependen de la disponibilidad de los recursos donde habita un organismo para tener un éxito reproductivo y dejar descendencia (Klemming, 2002). El conjunto de estas características anteriormente mencionadas representan mecanismos que determinan la distribución de la energía en las diferentes funciones vitales que dependen de la disponibilidad de los recursos (Salgado Negret, 2015).

### **3.3. Madurez sexual**

El tamaño de madurez sexual es una transición importante que está involucrado en la historia de vida de cualquier organismo, este puede ser definido de diferentes maneras: Hunter & de Valdivieso(1962), definen este rasgo como el estado en el que un individuo puede reproducirse. Christiansen & Burken (1979), lo define como la capacidad de producir gametos maduros. D'Ancona(1960), define madurez sexual como el tamaño alcanzado por un individuo en el que su desarrollo orgánico le permite reproducirse y marcar su forma adulta, y por ultimo Gramapurohit, Shanbhag, & Saidapur(2004), integra estos conceptos planteando que es una transición crítica en la historia de vida de las especies. Adicionalmente, Miaud, Guyétant, & Elmberg(1999) infieren que la variación en los estados de madurez se pueden atribuir a varios procesos y características, incluyendo la longitud del cuerpo larval en metamorfosis, duración del período de actividad, la disponibilidad de recursos, almacenamiento y mortalidad.

Los diferentes estados de madurez de un organismo se pueden evaluar de dos formas 1. con características externas (medidas morfológicas) e 2. con características internas (procesos de espermatogénesis y ovogénesis) dependiendo del grupo de estudio (Ortegón Tolosa , 2014). En el caso de los anfibios, se puede evaluar teniendo en cuenta estas dos características, donde se puede establecer la madurez sexual en los machos cuando son capaces de fertilizar los huevos puestos por las hembras y éstas tienen la capacidad de producirlos (tamaño y coloración de los huevos, huevos vitelogénicos y folículos ováricos) (Hunter & de Valdivieso, 1962; Crump, 1974). Ortegón Tolosa(2014), en su estudio sobre madurez y dimorfismo sexual de la ranita cohete *Colostethus aff fraterdanieli* establece el tamaño de madurez sexual a través de morfometría y observaciones macro y microscópicas de las gónadas. Sus resultados expresaron que los machos adultos mostraron todas las etapas de la espermatogénesis y la presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos, criterio para considerar la madurez en los machos.

### **3.4. Estrategias reproductivas**

Los anfibios presentan una diversidad de estrategias reproductivas que se asocian a los patrones de actividad y modos reproductivos (Valdez, 2012). Existen dos tipos básicos de estrategias reproductivas temporales en anfibios: prolongada y explosiva, por un lado la estrategia prolongada se caracteriza por tener una duración de varias semanas o meses, donde hay una alta competencia entre machos por las hembras, con formaciones de “leks” estables y machos territoriales, donde el éxito de los machos se basa en la eficacia del canto para atraer a las hembras. Por otra parte, la estrategia explosiva se caracteriza principalmente por un período de reproducción que se extiende por unos pocos días (incluso algunas horas) y por una llegada

sincrónica de ambos sexos al sitio de reproducción (Wells, *The social behaviour of anuran amphibians*, 1997; Valdez, 2012; Elgue, 2013).

La mayoría de las especies de anuros exhiben estrategias intermedias, es decir, diferentes poblaciones de una misma especie con distintas características (diferencias en las densidades de individuos o ubicación geográfica) pueden presentar diferentes estrategias (Elgue, 2013).

Por otra parte las diferentes estrategias presentadas por las hembras deben equilibrar la cantidad de energía dedicada a la reproducción, crecimiento y supervivencia, además de contemplar el compromiso entre cantidad y calidad de la descendencia. Además de lo anteriormente mencionado e independientemente de la estrategia reproductiva, las hembras con mayor tamaño corporal (adultas), probablemente son las que tienen mayor éxito reproductivo, ya que pueden alojar más cantidad de ovocitos o aumentar el tamaño de los mismos (Valdez, 2012; Elgue, 2013).

### **3.5. Modos reproductivos**

El concepto modo reproductivo en anfibios presenta problemas al momento de su definición, Salthe & Duellman(1973) define el modo reproductivo como una "combinación de factores oviposicionales y de desarrollo, que incluyen el sitio de oviposición, características del óvulo, características de la postura, la tasa y la duración del desarrollo, el tamaño de la eclosión y el tipo de cuidado parental; esta definición fue utilizada por Duellman & Trueb (1986). Crump (1974) y otros autores definen el modo reproductivo simplemente como la combinación del sitio de

oviposición y el tipo de desarrollo (Duellman & Trueb, 1986; Grosjean *et al.*, 2008; Haddad & Prado, 2005; Elgue, 2013; Valdez, 2012).

Por otro lado Salthe & Mecham(1974), formalizaron sus clasificaciones en dos grandes categorías: desarrollo acuático y desarrollo terrestre. La evolución de los diferentes modos reproductivos, especialmente la oviposición terrestre puede haber evolucionado en respuesta a diferentes factores como, la sequedad de estanques de agua, competencia o depredación en grandes cuerpos de agua (Crump, 2015), sin embargo las especies que presentan desarrollo directo requieren que sus hábitats presenten una alta humedad, una mayor profundidad de hojarasca y una alta cobertura vegetal ya que los huevos no presentan una cáscara protectora que los proteja contra la desecación (Duellman & Trueb, 1986; Rice *et al.*, 2006).

Entre las especies de desarrollo directo dentro de Terrarana la reproducción ocurre con posturas en tierra, sin requerimientos de cuerpos de agua para su desarrollo. La mayoría de individuos de este grupo depositan o liberan su postura bajo la hojarasca, piedras o cuevas en los árboles con una alta humedad para protegerlos posiblemente contra condiciones extremas que pueden presentar sus hábitats y así evitar la deshidratación (Duellman & Trueb, 1986). Este modo reproductivo ha evolucionado varias veces en este grupo, la causa que llevó a su independencia del agua se atribuye a la alta depredación que existe en el agua y a la presencia de yema de huevo que nutre al embrión durante todo su desarrollo que se lleva a cabo dentro del huevo para después eclosionar como pequeñas ranitas (Duellman & Trueb, 1986; Zuger *et al.*, 2001).



### 3.6. Tamaño de la postura

El tamaño de la postura que también es un rasgo de historia de vida hace referencia al número de huevos que puede ovipositar una hembra en cada época reproductiva (Salgado Negret, 2015), este rasgo permite medir o estimar la fecundidad, es decir, determina el esfuerzo reproductivo instantáneo de una hembra al momento de ovipositar cada postura (Duellman & Trueb, 1986). Guayara Barragán & Bernal (2012), consideran que mucha de la energía en anfibios es invertida principalmente en el tamaño de los huevos y en el número de huevos que puede depositar una hembra en cada postura. Esta característica determina el éxito reproductivo de cada especie para colonizar los diferentes hábitats (Miaud *et al.*, 1999; Guayara Barragán & Bernal, 2012). Por otro lado, Morrison & Hero(2003), argumentan que el tamaño de la postura (nidada) depende del periodo de actividad o época reproductiva que varía entre especies y entre individuos, no obstante las posturas (nidada) producidas durante un año o una estación pueden disminuir con la reducción de la temporada de cría.

Por otra parte, en la mayoría de las especies de anfibios existe una variación en el tamaño de la postura que se da como resultado de las condiciones ambientales, lo cual tiene consecuencias importantes en la fisiología de los descendientes, cambios en su osmoregulacion, transporte de iones, secreción de enzimas digestivas y absorción de nutrientes(Wells, 2007; Salgado Negret, 2015). Esta variación se ve influenciada por el tamaño de las hembras, es decir un tamaño corporal grande implica mayor energía al esfuerzo reproductivo teniendo efecto en huevos más grandes o posturas más grandes o frecuentes (Guayara Barragán & Bernal, 2012; Salgado Negret, 2015). Crump (1974) observo que dentro de algunas especies de desarrollo directo (*P.*

*altamazonicus*, *P. lacrimosus*, *P. lanthanites*) existe una relación entre el tamaño y el número de huevos que puede ovipositar una hembra.

### **3.7. Taxón Terrarana Brachycephaloidea**

Los individuos que pertenecen a este taxón han colonizado con éxito los bosques montanos en el Nuevo Mundo gracias a su reproducción que no depende de cuerpos de agua (Hedges *et al.*, 2008; Pyron & Wiens, 2011). Actualmente comprende cinco familias (1068 especies): Brachycephalidae, Eleutherodactylidae, Strabomantidae, Ceuthomantidae y Craugastoridae que se extienden desde el sur de Texas en los Estados Unidos, a través de México, Centroamérica y las Antillas hasta llegar a América del Sur tropical y subtropical en el norte de Argentina (Heinicke *et al.*, 2018).

Las especies relacionadas en este Taxón han presentado cambios significantes en su clasificación, dependiendo de análisis morfológicos (Lynch, 1971; 1986; Lynch & Duellman, 1997) o de herramientas y análisis moleculares (Heinicke *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Heinicke *et al.*, 2009; Pyron & Wiens, 2011; Heinicke *et al.*, 2018) que actualmente estableció una propuesta taxonómica de este gran complejo (Hedges *et al.*, 2008; Pyron & Wiens, 2011; Ospina Sarria, 2012), el cual comprende una serie de familias destacándose Strabomantidae (785 especies), que originalmente fue nombrada por Heinicke *et al.* (2007) para dar cabida principalmente a un clado que incluye la mayoría de las especies de América Central y América del Sur (Heinicke *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Heinicke *et al.*, 2018). La familia Strabomantidae está compuesta por cuatro subfamilias (Hypodactilinae, Holoadeninae, Pristimantinae y Strabomantinae) que se reproducen lejos de cuerpos de agua, característica que

les permitió ocupar ambientes como los páramos, bosques altoandinos hasta los bosques húmedos tropicales (Hedges *et al.*, 2008; Acosta Galvis, 2017; Heinicke *et al.*, 2018).

### **3.8. *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1871**

Dentro de la familia Strabomantidae se encuentra el género *Pristimantis* es el más diverso en el Neotropico con 545 especies reconocidas hasta el momento (Frost, 2018), su distribución incluye tierras bajas y elevaciones próximas a los 4000 m en los Andes Colombianos, Ecuatorianos y Peruanos (Hedges *et al.*, 2008; Frost, 2018). Heinicke *et al.* (2007), reintegro este género para las especies que tienen distribución en Sur América “Clado Sudamericano” en la parte Noroccidental (Heinicke *et al.*, 2007; Heinicke *et al.*, 2018). Debido al gran número de especies, este género fue dividido en 16 grupos, además se incluyen 34 especies que no han sido asignadas hasta el momento en los grupos; por otra parte, Padial *et al.* (2014) mediante análisis de secuencias de ADN disponibles en GenBank establece una serie de filogenias donde se observa las diferentes agrupaciones de las especies de este género, corroborando y fortaleciendo algunas agrupaciones que fueron establecidas por Hedges *et al.* (2008).

#### 4. ESTADO DEL ARTE

Diversos autores han determinado que las diferentes estrategias reproductivas en anfibios se encuentran asociadas a los patrones de actividad y modos reproductivos (Crump, 1974; Duellman & Trueb, 1986; Zúguez *et al.*, 2001). Estos modos han sido ampliamente reconocidos en la reproducción de los anfibios y definidos principalmente por factores relacionados con el sitio de oviposición, el tipo de desarrollo, tamaño de madurez y las características tanto de los huevos como de las puestas (Duellman & Trueb, 1986; Elgue, 2013).

Los trabajos realizados se han centrado principalmente en especies de tierras bajas de Brasil y Centro América. Entre estos, Crump, (1974), describió los parámetros reproductivos de una serie de especies que habitan en la región tropical, al margen de un tributario del río Amazonas, al este de Ecuador. En sus resultados sobre los modos reproductivos de estas especies (huevos en el agua, huevos en vegetación sobre el agua, y huevos de desarrollo directo) encontró una correlación positiva significativa entre la longitud LRC y la fecundidad. Por otro lado, establece que dentro de lagunas especies del clado Terrarana (*P. altamazonicus*, *P. lacrimosus*, *P. lanthanites*) existe una relación entre el tamaño y el número de huevos que puede ovipositar una hembra; sin embargo, Pacheco Florez & Ramírez Pinilla(2014) en su trabajo sobre la ecología reproductiva de *Geobatrachus walkeri* no encontraron una relación entre el tamaño y el número de huevos.

Duellman(1988), establece que los modos reproductivos que presenta cada especie se relacionan con las características del hábitat donde están presentes. Sus resultados indican que los modos que implican huevos terrestres dependen para su supervivencia de un alto contenido de humedad y por otro lado, los modos que implican huevos acuáticos requieren de la presencia de arroyos de alto gradiente o hábitats acuáticos para el desarrollo de sus larvas. Por otro lado, Perotti(1997), estudió la reproducción en un ensamble de anuros del Chaco semiárido de Argentina. En sus resultados encontró especies con modos reproductivos de larvas acuáticas y especies con modos reproductivos terrestres, además de esto, también observó una correlación positiva entre el tamaño de las hembras y el tamaño de los huevos, tamaño de las hembras y número de huevos maduros, y una correlación negativa entre el tamaño de la puesta y el tamaño de los huevos.

Valdez(2012), describe el modo reproductivo de una población uruguaya de *Odontophrynus americanus*. En sus resultados encontró que las hembras son significativamente más grandes que los machos, además encontró una asociación positiva significativa entre la masa del ovario y la masa corporal, entre la fecundidad y largo LRC. Con los datos que obtuvieron dedujeron que el tamaño corporal (LRC) limita el alojamiento de los ovocitos, por lo tanto, las hembras adultas con mayor tamaño tienen mayor éxito reproductivo, ya que invierten más en gametos que las hembras pequeñas, las que todavía deben invertir en el crecimiento para asegurar su éxito reproductivo en el futuro.

Para Colombia se han publicado algunos trabajos sobre la biología reproductiva en anuros que tienen enfoques más en el estudio de los modos que utilizan las especies para asegurar el éxito reproductivo dentro de sus poblaciones (Zornosa Torres, 2011). Sin embargo, cabe mencionar

que dentro de estos trabajos en sus objetivos incluyen los cortes histológicos como una alternativa para evidenciar los procesos de espermatogénesis con el fin de determinar el estado de madurez de un individuo, caso es el trabajo realizado por Valderrama Vernaza *et al.* (2010), en el cual estudiaron la actividad reproductiva de la rana *Ranitomeya virolinensis* comparando la estructura edad-sexo, la morfología y morfometría de las gónadas. En sus resultados mediante cortes histológicos de las gónadas en machos encontraron túbulos seminíferos con quistes de todas las etapas espermatogénicas y espermatozoides, procesos que evidencian que los machos entran en su etapa reproductiva.

Por otro lado, Ortegón Tolosa (2014), en su estudio establece el tamaño mínimo de madurez sexual a través de morfometría y observaciones macro y microscópicas de las gónadas. Sus resultados expresaron que los machos adultos mostraron todas las etapas de la espermatogénesis y la presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos. Además de estos trabajos mencionados para Colombia se destaca el realizado por Carezzano *et al.* (2015), un estudio completo acerca de la morfohistología testicular, en el cual se conocen aspectos detallados de los testículos y sus procesos espermatogénicos (espermatogonias I, II). Finalmente concluyen que la morfohistología de los testículos analizados muestra características similares a las observadas en otros anfibios neotropicales, y presentan todas las células del linaje espermatogénico en un mismo lóculo.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- ❖ Evaluar la variación del tamaño mínimo de madurez sexual y del tamaño de la postura en *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* pertenecientes a dos clados filogenéticos distintos que se encuentran distribuidas en los departamentos de Nariño y Cauca.

### 5.2. Objetivos específicos

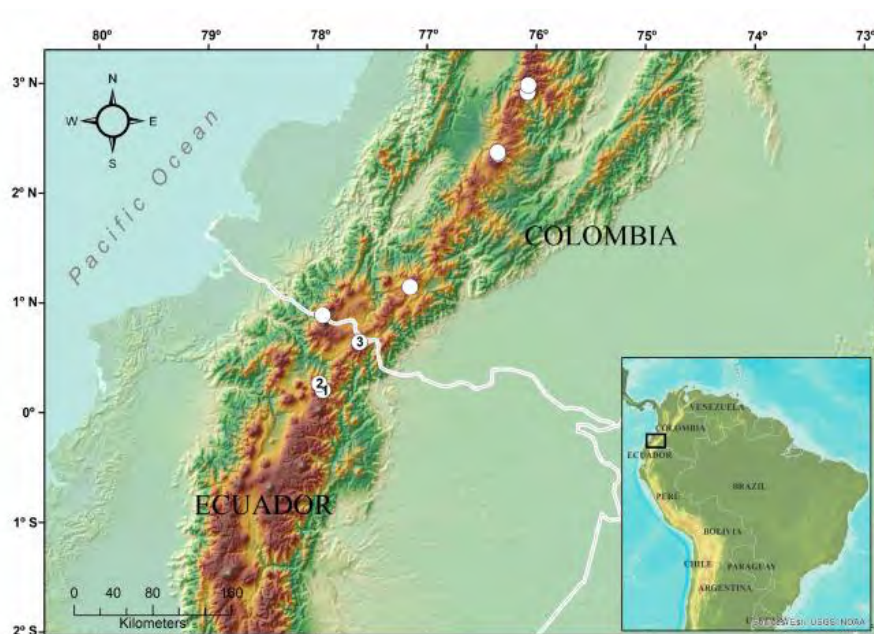
- ❖ Determinar el estado de madurez sexual y tamaño de la postura en machos y hembras de *P. myersi* y *P. unistrigatus*.
- ❖ Comparar los aspectos reproductivos estudiados de *P. myersi* y *P. unistrigatus* en torno a los modos reproductivos de los anfibios y a las filogenias actualmente propuestas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. *Pristimantis myersi* (Goin and Cochran, 1963)

*Pristimantis myersi* (♀= 17.5–23.2 y ♂= 13.7–17.5 mm) es una especie que pertenece a uno de los géneros más diversos en el Neotropico (Hedges *et al.*, 2008). La distribución de esta especie está limitada en los departamentos del Cauca a 2.900–3.000 msnm y Nariño a 2900–3275 msnm (Lynch, 1981; Castro, Herrera, & Lynch, 2004), además se cuenta con registros en el norte del Ecuador (Figura 1) (Rojas Runjaic & Guayasamin, 2015). *P. myersi* es una rana de hojarasca que habita en bosques andinos y páramos, de actividad nocturna, terrestre y vive en zonas no alteradas (Rojas Runjaic & Guayasamin, 2015). Por otra parte, según la clasificación de Padial *et al.* (2014) está dentro de las especies del grupo *P. myersi* el cual alberga un total de 17 especies.





**Figura 1.** Distribución de *Pristimantis myersi* familia Craugastoridae.

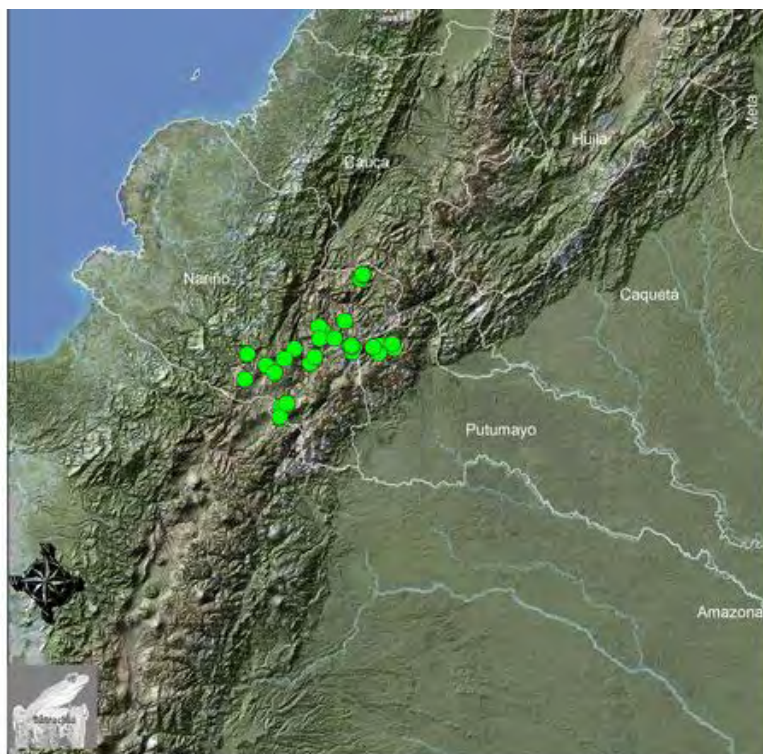
Fuente: Rojas-Runjaic & Guayasamin, 2015.

Actualmente está clasificada por la IUCN en la categoría de preocupación menor (Coloma *et al.*, 2010a); sin embargo, su rango de distribución ha sufrido pérdida de hábitat, principalmente por la deforestación y el continuo desarrollo de la agricultura (Varela Jaramillo & Páez Rosales, 2017; López Noguera, 2015). Según Lynch & Duellman(1997), no se tiene evidencia de que el grupo *P. myersi* sea monofilético, ni hay evidencia de lo contrario (Lynch & Duellman, 1997; González Duránet *al.*, 2017).

## 6.2. *Pristimantis unistrigatus* (Günther, 1859)

*Pristimantis unistrigatus* (♀ 22.5–38.5 y ♂ 14.9–28.8 mm) se distribuye desde los Valles interandinos del sur de Colombia hasta el centro de Ecuador (Lynch, 1981; Frost, 2018). En Colombia se encuentra en los departamentos de Nariño y Putumayo entre los 1500–3230 msnm

(Figura 2) (Lynch, 1981; Acosta Galvis, 2017), además se tiene registros en el noroccidente del Ecuador en tres provincias de Cotopaxi, Imbabura y Pichincha entre los 2200 a 3400 msnm (Ron *et al.*, 2015). Esta especie habita en pastizales, áreas cultivadas pastos, bordes forestales y áreas urbanas, es de actividad nocturna (Lynch, 1981; Mueses Cisneros, 2005). Por otra parte, según la clasificación de Padialet *al.*(2014) está dentro del grupo *P. unistrigatus* en el cual han sido asignadas un total de 193 especies.



**Figura 2.** Distribución de *Pristimantis unistrigatus* familia Craugastoridae para Colombia.

Fuente: Acosta-Galvis & Cuentas, 2017.

Actualmente está clasificada por la IUCN en la categoría de preocupación menor (Coloma *et al.*, 2010b); sin embargo las poblaciones presentan una principal amenaza como la fragmentación y urbanización para el asentamiento de poblaciones humanas lo que ha generado un impacto en su hábitat (Mueses Cisneros, 2005; Coloma *et al.*, 2010b).

### 6.3. Material examinado

El material examinado para la presente investigación se encuentra depositado en la colección Herpetológica de la Universidad de Nariño (Pasto). Este material fue colectado dentro del proyecto de delimitación de páramos que se ejecutó durante el año 2015 por el grupo de investigación Biología de Páramos y Ecosistemas Andinos de la Universidad de Nariño.

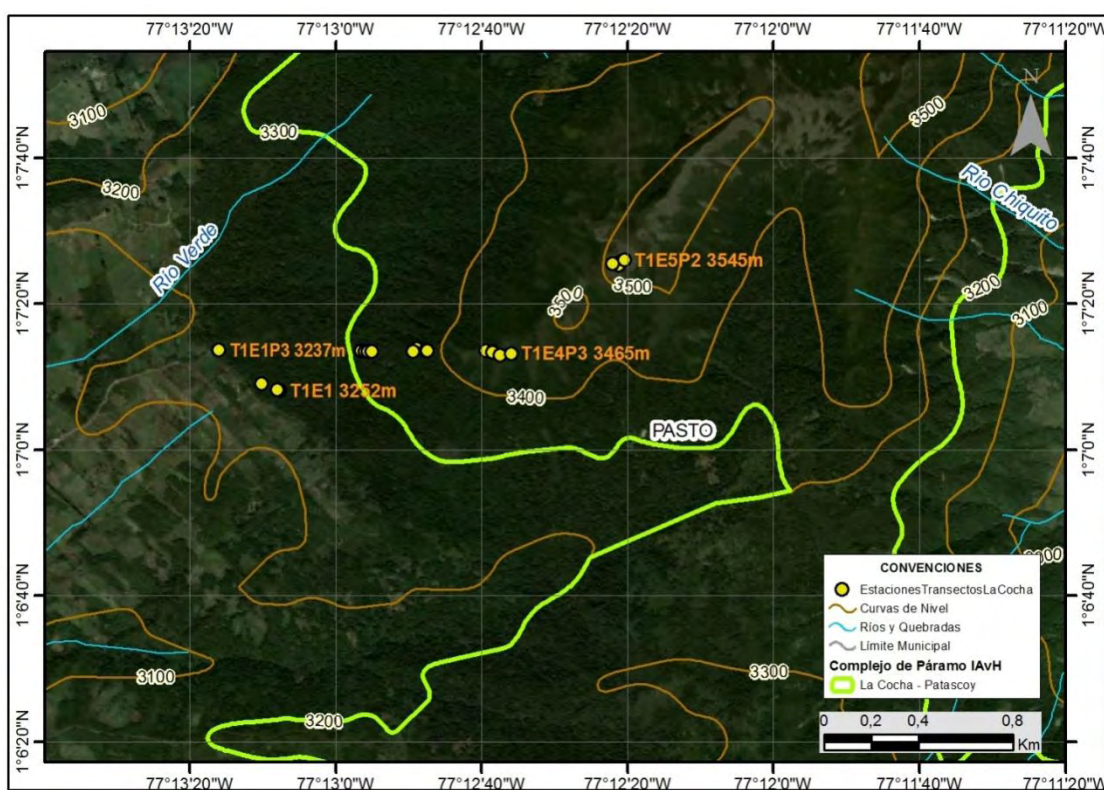
Las áreas de estudio que se encuentran dentro del proyecto anteriormente mencionado están en el Departamento de Nariño en los municipios de Puerres, Pasto, Tangua, El Tablón de Gomez y La Cruz, en el Departamento del Cauca en el municipio de Bolívar (Tabla1).

**Tabla 1. Localidades de muestreo; Puerres, Pasto, Tangua, El Tablón de Gomez y La Cruz (Nariño) y Bolívar (Cauca).**

<b>Departamento de Nariño</b>		
<b>Municipio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Altura (msnm)</b>
<b>Puerres</b>	Vereda Desmontes Alto, páramo de Puerres	3102 – 3189
<b>Pasto</b>	Corregimiento de Morasurco, Vereda La Merced, Cerro Morasurco	3269 – 3331
<b>Tangua</b>	Vereda Las Palmas, páramo Ovejas-Tauso	3290 – 3507
<b>El Tablón de Gomez</b>	Vereda El Silencio, Laguna El Silencio	2800 – 3200
<b>La Cruz</b>	Vereda Paramito, Reserva Santa Helena	3200 – 3600
<b>Departamento del Cauca</b>		

<b>Bolívar</b>	Vereda Belén, Cerro El Banco	3600
----------------	------------------------------	------

Para la colecta de los ejemplares se seleccionaron y muestrearon transectos altitudinales de los complejos: Chiles-Cumbal (CHC) se establecieron dos transectos, el primero (T1) se ubicó en la vereda los Cedros y el segundo (T2) en la vereda Esnambud, por otro lado en el complejo La Cocha-Patascoy (LCP) se establecieron cinco transectos, el primero (T1) se ubicó en la vereda Bajo Casanare, el segundo transecto (T2) se ubicó en la vereda Los Alisales, el tercer transecto (T3) en la vereda Desmontes, el cuarto (T4) en la vereda Santa Lucia y el quinto en la vereda La Merced y en el complejo Doña Juana se establecieron cuatro transectos, el primero (T1) en la vereda El Silencio, el segundo (T2) en la vereda Paramito, el tercero (T3) en la vereda Belén y el cuarto en la vereda los Andes.



**Figura 3.** Localización geográfica de las estaciones de muestreo en el transecto CHCT1. Complejo de páramos Chiles-Cumbal. Universidad de Nariño-Instituto Humboldt.

Fuente: Solarte *et al.*, 2015.

En cada transecto anteriormente mencionado se marcaron de 4 a 5 estaciones de muestreo estableciendo cuatro parcelas de 50 m x 4 m en cada estación, las cuales fueron revisadas en grupos de cuatro personas, durante la tarde y la noche con la misma intensidad horaria (3h). Se realizó una revisión exhaustiva en cada estrato vegetal: rasante, herbáceo, arbustivo y arbóreo y en cada microhábita. Adicionalmente, se realizaron recorridos aleatorios para registrar el mayor número de especies (Solarte *et al.*, 2015). Se tomaron medidas morfológicas como: LRC, ancho de la cabeza, ancho a la altura de la boca, longitud del antebrazo, longitud de la tibia, longitud del fémur, longitud del pie; como también datos de hábitat y microhábitat: posición vertical, sustrato (hojarasca, helecho, musgo, brómelas, etc.), posición horizontal (ubicación de los individuos respecto a cuerpos de agua) y el tipo de actividad diurna o nocturna según la metodología de Solarte *et al.*(2015).

Por otro lado el material examinado de *Pristimantis unistrigatus* fue colectado durante el desarrollo de la tesis doctoral de Cepeda Quilindo(2014), siguiendo el protocolo de búsqueda libre y sin restricciones por cuadrantes en el trayecto Pasto-Chachagui, donde se ubicaron cuatro puntos de muestreo; Km 23, Reserva el Morar, Centro Ambiental Chimayoi y Granja experimental Botana (Tabla 2).

Los individuos capturados se encuentran depositados en la colección Herpetologica PSO-CZ de la Universidad de Nariño con el código de campo BCQ (acrónimo Belisario Cepeda-Quilindo).

**Tabla 2. Localidades de muestreo; Km23, Reserva el Morar, Centro Ambiental Chimayoi y Granja experimental Botana.**

Localidad	Altura (msnm)	Coordenadas
<b>Km23</b>	2350	1° 17' 58" N, 77° 16' 8" W
<b>Reserva el Morar</b>	2650	1° 17' 58" N, 77° 16' 8,03" W
<b>Centro Ambiental Chimayoi</b>	2750	01° 15' 53,5" N, 77° 17' 19,3" W
<b>Granja experimental Botana</b>	2850	01° 09' 12" N, 77° 18' 31"; W

#### 6.4. Trabajo en laboratorio

Se revisaron 130 ejemplares de *Pristimantis myersi* individuos en 86 hembras (66,15%) y 44 machos (33,85%). Del total de las hembras revisadas en el laboratorio se seleccionaron 43 individuos de diferentes tamaños (SVL) y fueron diseccionados manualmente haciendo una incisión abdominal horizontal según el protocolo de (Asenjo *et al.*, 2011), esto con el fin de realizar el conteo de folículos, diámetro de folículos y diámetro del oviducto. Para la verificación de los individuos se siguieron las descripciones de Lynch (1981), Rojas Runjaic & Guayasamin(2015).

Los machos, dependiendo del estado gonadal, fueron clasificados en individuos activos reproductivos y comenzando actividad reproductiva dependiendo de las etapas de espermatogénesis que presentaron según la clasificación de Saidapur(1983). Adicionalmente se

registró el tamaño de los dos testículos en sus respectivos ejes con ayuda de una cámara digital Leica DFC 300F adaptada al microscopio, y posteriormente se extrajo el testículo izquierdo para su análisis (Ortega *et al.*, 2005; Asenjo *et al.*, 2011). Se determinaron las etapas de espermatogénesis según la clasificación de Saidapur (1983); etapa 1: espermocitos primarios y secundarios; etapa 2: espermátidas tempranas; etapa 3: espermátidas tardías; etapa 4: presencia de haces de esperma en el borde luminal del túbulo seminífero; y la etapa 5: esperma maduro en la luz del túbulo seminífero. Los machos que posean cistos de espermatozoides libres de esperma en la luz de los túbulos seminíferos se consideraran como reproductivos (Valderrama Vernaza *et al.*, 2010).

Sumado a estos registros, se analizaron caracteres sexuales secundarios: presencia de saco vocal, hendiduras vocales y presencia de cojinetes nupciales.

Las hembras fueron clasificadas en individuos juveniles, sub-adultas y adultas (Lynch & Duellman, 1997). Para determinar estas categorías de madurez sexual, se realizaron observaciones y descripciones del aparato reproductor bajo un estereoscopio óptico Carl Zeiss. Se tuvo en cuenta las siguientes características: presencia de folículos vitelogénicos, color de los folículos en el oviducto, cuerpos grasos (Ortegón Tolosa, 2014) y forma del oviducto según las clasificaciones de Donnelly (1999) y Lynch & Duellman (1997) las cuales establecen tres clases de tamaño y forma del oviducto; I: oviducto estrecho y recto, ancho  $\leq 0,3$  mm; II: oviducto ligeramente ondulado,  $0,3 \text{ mm} \leq \text{ancho} < 0,8 \text{ mm}$ ; III: oviducto convoluto,  $0,7 \text{ mm} \leq \text{anchura} \leq 2,3 \text{ mm}$ . Para establecer el tamaño de la postura se realizó un conteo minucioso de los folículos en las dos especies de estudio.

En el caso de *Pristimantis unistrigatus*, ya se tenían datos del tamaño de la postura, número de folículos y cortes histológicos (Cepeda Quilindo, 2014).

### 6.5. Análisis histológico

De los 44 machos utilizados en este trabajo, se seleccionaron 20 individuos de diferentes tamaños para el análisis histológico, determinar la madurez sexual y la condición reproductiva en machos de *Pristimantis myersi*. Se midió el largo (L) y ancho (A) de los testículos para estimar su volumen (VT) utilizando la fórmula del esferoide ( $VT = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot L/2 \cdot (A/2)^2$ ) (Martori *et al.*, 2005). Para el análisis histológico de los testículos se siguió la metodología propuesta por Asenjo *et al.* (2011), con algunas modificaciones relacionadas en las diluciones. Según esta metodología, los testículos se almacenaron en tubos eppendorf y se deshidrataron en una serie de diluciones de etanol al 70, 80, 96, y 100 % por 5 min en cada solución. Posteriormente se trasladó la muestra a xilol absoluto por 5 min, con el fin de que esta solución penetre en todo el tejido y ayude a conservarlo y aclararlo, luego de este paso se agregó parafina la cual fue reemplazando al xilol, para así de esta manera mantener la forma del tejido.

Con la ayuda de un micrótopo Minot, se procedió a realizar cortes seriados longitudinales de 6  $\mu$  que incluían las gónadas y los ductos. La preparación y coloración de los tejidos se hizo con Hematoxilina de Harris – eosina amarillenta (Asenjo *et al.*, 2011). El procedimiento constó de una serie de pasos: 1) se desparafinó los cortes en xilol por 3 min, 2) seguidamente se hidrataron los cortes en diferentes diluciones de alcohol 100%, 95% y 70% por 3 min, 3) posteriormente se colorearon con la solución de hematoxilina de Harris de 3 a 5 min, 4) para eliminar el exceso de colorante se empleó alcohol ácido hasta que el tejido de interés lo único que permaneciera teñido, 5) la placa nuevamente se sometió a coloración con una solución



alcohólica o acuosa de eosina por 3 a 5 min, 6) seguidamente las placas fueron sometidas a deshidratación en baños crecientes de alcohol a concentraciones de 70%, 95% y 100% y se aclaró con xilol por 2 min, y finalmente se sellaron las láminas con Entellan®. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio Leica DM 4000 B, para las fotomicrografías se utilizó una cámara digital Leica DFC 300Fx adaptada al microscopio (Asenjoet *al.*, 2011).

Para el caso *Pristimantis unistrigatus* los cortes histológicos se realizaron durante la ejecución de la tesis Doctoral de Cepeda Quilindo(2014). Estos cortes histológicos fueron realizados en el laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, Universidad Industrial de Santander.

## 6.6. Análisis estadístico

La existencia de dimorfismo sexual en tamaño (LRC) entre machos y hembras de *Pristimantis myersi* se probó mediante una prueba paramétrica t-Students para muestras independientes, ya que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y de homosedasticidad.

Para la determinación de la madurez sexual en hembras de *Pristimantis myersi*, en las tres categorías establecidas con relación al tamaño del cuerpo (LRC) se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el fin de establecer la existencia de diferencias significativas entre estas categorías. Estas pruebas estadísticas se realizaron con el software RStudio.

Posteriormente se evaluó la relación entre las variables cuantitativas de tamaño corporal vs tamaño de postura, tamaño de folículos y tamaño del oviducto mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El grado de la relación se estableció mediante la expresión  $R^2$ , cuyo valor permite conocer el grado de asociación entre las dos variables cuantitativas estudiadas.

### **6.7. Comparación de los aspectos reproductivos de los grupos *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus***

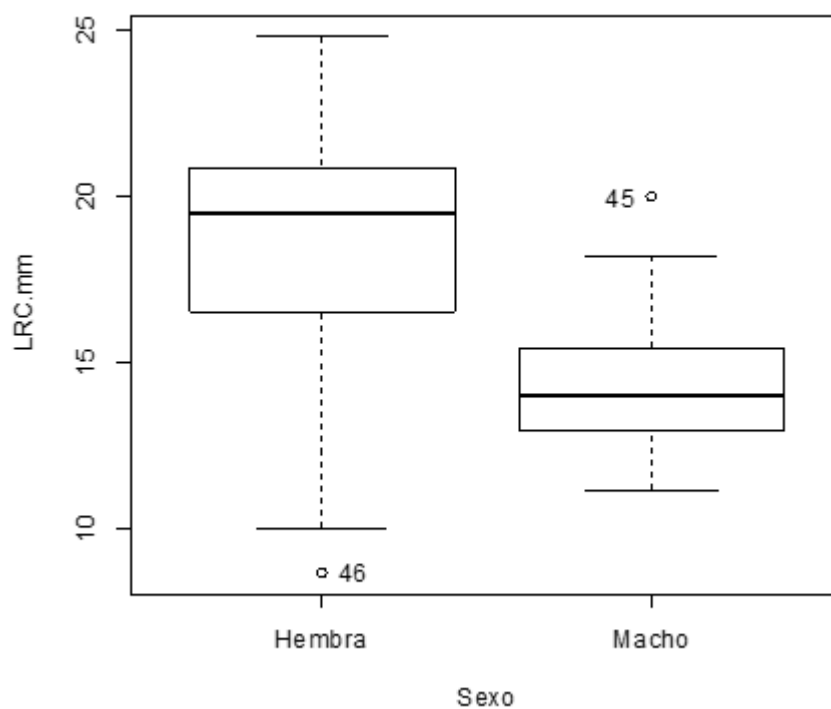
Para la comparación de los parámetros reproductivos entre *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* se tomó como referencia la clasificación de González Durán *et al.* (2017) y Padialet *et al.* (2014). Se realizó una revisión rigurosa sobre biología reproductiva en especies que han sido incluidas en el grupo *Pristimantis myersi* el cual contiene en total 17 especies así mismo las especies que han sido incluidas en el grupo *Pristimantis unistrigatus* que contiene 193 especies, esto con el fin de establecer similitudes o diferencias en las características entre las especies de cada grupo.

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron comparados con los trabajos de del Pino (1997) y con los resultados previos de uno de los capítulos de la tesis doctoral de Cepeda Quilindo (2014), “Fenología reproductiva y características de historia de vida de *Pristimantis unistrigatus* (Anura: Strabomantidae) en un gradiente altitudinal de los Andes del suroccidente de Colombia”, tesis doctoral que se encuentra en proceso.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Dimorfismo sexual en *Pristimantis myersi*

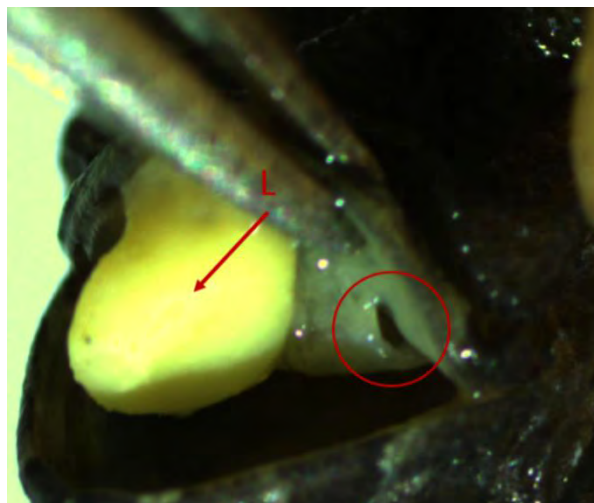
Los resultados sobre dimorfismo sexual registran una clara diferencia entre los machos y las hembras de *P. myersi*, donde las hembras son significativamente más grandes que los machos ( $t=6,8$ ;  $p<0.05$ ;  $gl= 87$ ). El tamaño promedio de las hembras totales fue de 18.53 mm (DS: 3,6, Intervalos: 15,4–24,8,  $N$ : 35) y los machos de 14.29 (DS: 1,87, Intervalos: 11,5–19,99,  $N$ : 45) (Figura 3).



**Figura 4.** Longitud rostro–cloaca (en mm) entre hembras y machos de *Pristimantis myersi*. Los números dentro de la figura, representan el *N* de cada sexo.

Fuente: este estudio

Por otra parte los machos adultos presentan un pequeño saco vocal, subglar poco visible y hendiduras vocales que se ubican atrás de la lengua (Figura 4). No fue posible observar la almohadilla nupcial (obs. pers), aunque Lynch (1981) describe que los machos adultos presentan una almohadilla de color blanca.



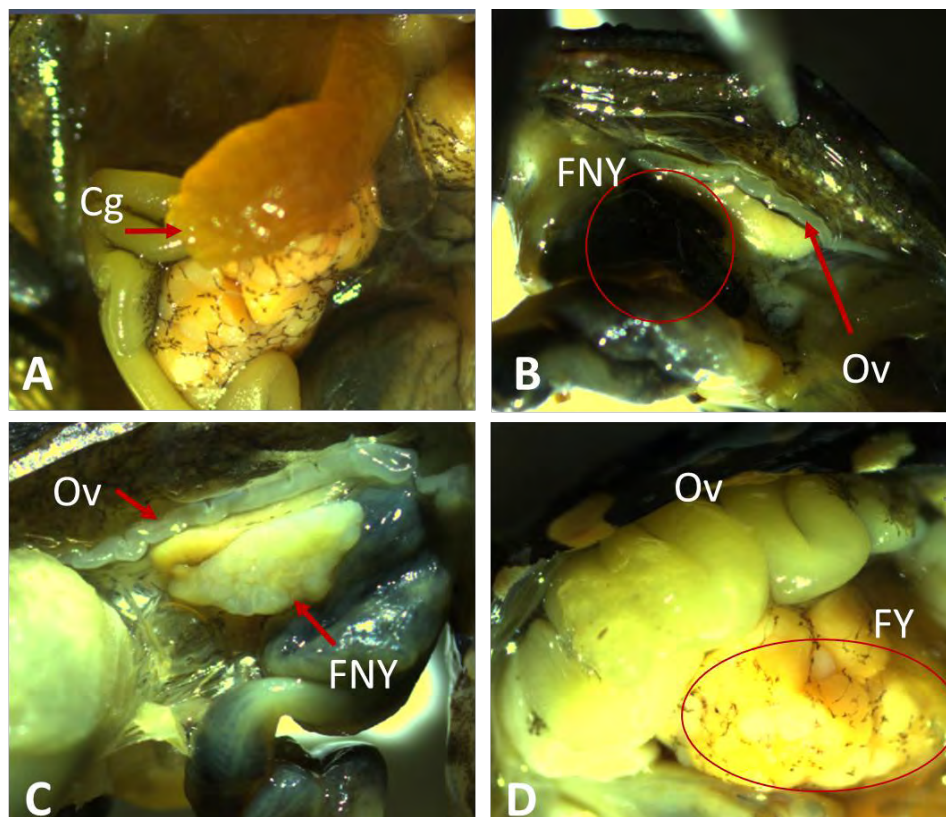
**Figura 5.** Boca de *Pristimantis myersi*, donde se muestran las hendiduras vocales (círculo rojo), (L: lengua).

Fuente: este estudio

## **7.2. Descripción del aparato reproductor de *Pristimantis myersi***

### **7.2.1. Sistema reproductor femenino**

El sistema reproductor de las hembras de *P. myersi* está formado principalmente por ovarios y oviductos; además, presenta estructuras accesorias conocidas como cuerpos adiposos o cuerpos grasos (Figura 5A). Las hembras presentan dos ovarios lobulados ubicados ventralmente a los riñones y suspendidos por el mesovario. De acuerdo con la madurez sexual del individuo, se observan variaciones en la coloración de los folículos y en el desarrollo de los oviductos. En las hembras inmaduras se observan folículos despigmentados (blancos) en forma de masa, cubierta en algunos casos por un tegumento gris y con un oviducto recto y delgado (Figura 5B, C), y en el caso de las hembras maduras los folículos son pigmentados (amarillos) y con un oviducto convoluto grueso (Figura 5D).



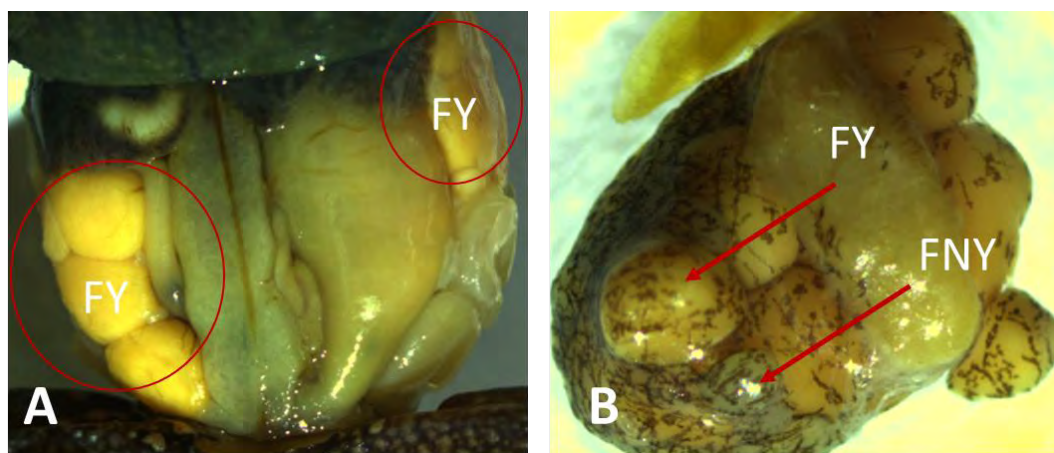
**Figura 6.** Aparato reproductor de una hembra de *Pristimantis myersi*. Cuerpos grasos (A), oviducto recto y masa de folículos cubierta de tegumento negro (B), oviducto recto y masa de folículos blanca (C), oviducto convoluto grueso y folículos pigmentados (D), (Cg: cuerpos grasos, Ov: oviductos, FNY: folículos no yemados y FY: folículos yemados). Las imágenes A y D corresponden a una hembra madura y las imágenes B y C corresponden a hembras inmaduras.

Fuente: este estudio

Los oviductos son órganos tubulares y pareados ubicados a lado y lado de los ovarios. En las hembras inmaduras los oviductos están presentes con ciertas circunvoluciones y muy poco desarrollados (de pequeño tamaño y grosor) (Figura 5C); en comparación con las hembras maduras que presentan oviductos muy desarrollados, de gran tamaño y grosor, con gran cantidad

de circunvoluciones (Figura 5D). Por otra parte, los cuerpos grasos son estructuras digitiformes de color amarillo y de diversos tamaños, que se encuentran presentes tanto en hembras maduras como en hembras inmaduras (Figura 5A).

En la etapa reproductiva, los folículos yemados ocupan una zona amplia y pueden ocupar prácticamente todo el abdomen (Figura 6A). En general su forma es racimosa por la presencia de folículos yemados y no yemados de diferentes tamaños (Figura 6B).



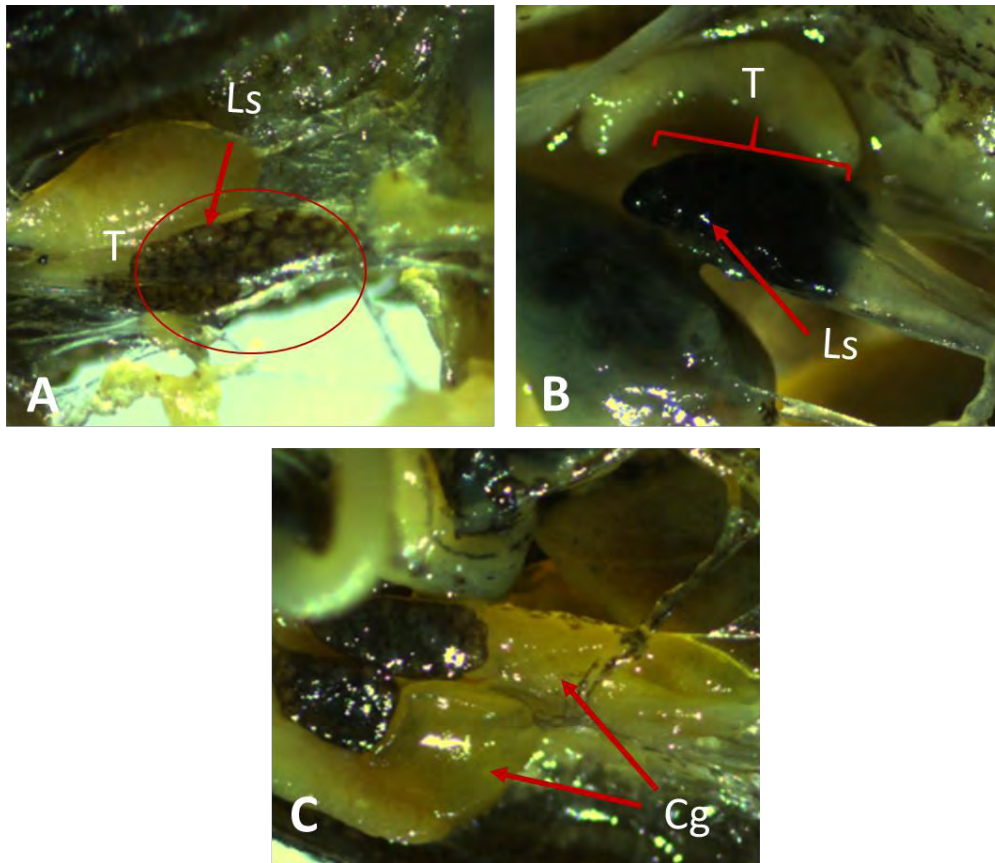
**Figura 7.** Folículos distribuidos en el cuerpo de una hembra adulta de *Pristimantis myersi*. Distribución de folículos en todo el abdomen, desde la vida ventral (A), folículos yemados y no yemados en forma racimosa (B), (FY: folículos yemados, FNY: folículos no yemados).

Fuente: este estudio

### 7.2.2. Sistema reproductor masculino

El sistema reproductor masculino de *Pristimantis myersi* está constituido por los testículos, que son órganos ovoides pareados ubicados dentro de la cavidad celómica y de forma simétrica, en posición abdominal a los riñones, ligados a estos por el mesorquio. Los testículos en los machos sub-adultos se observan de una coloración opaca (blanco–negro) (Figura 7A). En machos adultos los testículos se observan con una pigmentación, lo cual es causado por

melanosomas, de esta manera se observan testículos de una coloración negra (Figura 7B), no se pudo observar la coloración de los machos juveniles, ya que en este trabajo no se logró obtener individuos de menor tamaño. Al igual que en las hembras se identifican cuerpos grasos como estructuras digitiformes de color amarillo intenso y de diversos tamaños, presentes tanto en machos maduros como inmaduros (Figura 7C).



**Figura 8.** Aparato reproductor de un macho de *Pristimantis myersi*. Testículo de coloración opaca (blanca–negra) de macho sub–adulto o adulto (A), testículo de coloración oscura de macho adulto (B), cuerpos grasos (C), (T: testículo, Ls: lóculo seminífero, Cg: Cuerpos grasos).

Fuente: este estudio



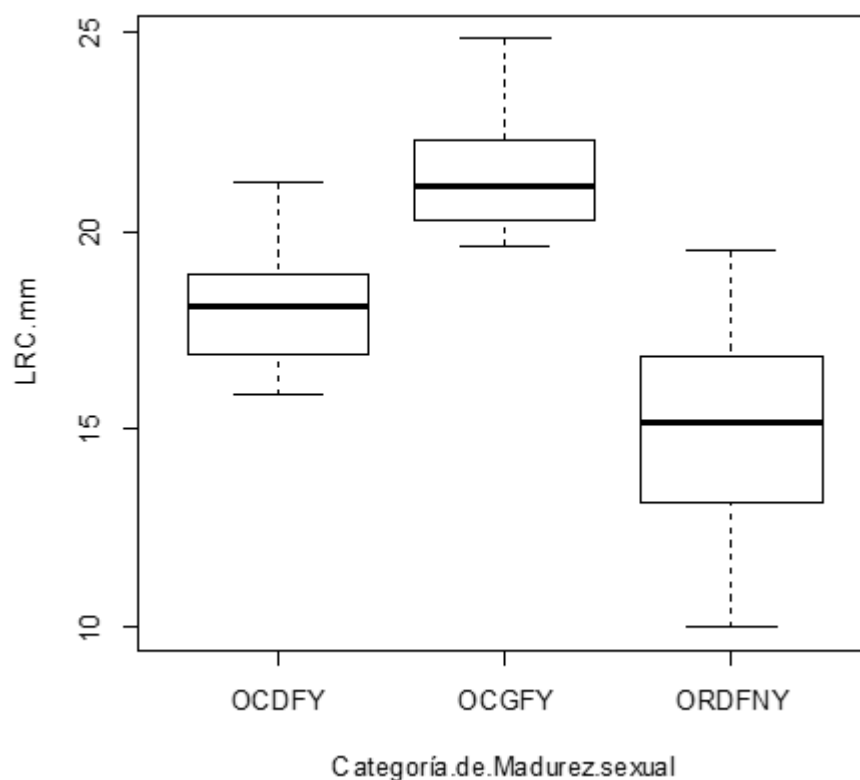
En los testículos que presentan las dos coloraciones se puede observar claramente los lóculos seminíferos (Figura 7A, B) donde se desarrollan las células germinativas (Ortegón-Tolosa, 2014).

### **7.3. Madurez sexual**

#### **7.3.1. Determinación de madurez sexual en hembras de *Pristimantis myersi***

En el análisis del estado de desarrollo de las gónadas de las hembras se establecieron tres categorías con relación al tamaño del cuerpo (Figura 8). Una clase con oviducto recto y delgado y folículos no yemados (ORDFNY) con tamaño promedio de 15.05 mm (SD: 2.7, intervalos: 10.0–19.5,  $N$ : 12) que corresponde a hembras juveniles e inmaduras, una segunda clase con oviducto convoluto y delgado y folículos yemados (OCDFY) con un tamaño promedio de 18.13 mm (SD: 1.6, intervalos: 15.8–21.2,  $N$ : 8) que corresponde a hembras sub–adultas y maduras y una tercera clase con oviducto convoluto grueso y folículos yemados (OCGFY) un tamaño promedio de 21.44 mm (SD: 1.4, intervalos: 19.5–24.8,  $N$ : 19) que corresponde a hembras adultas y maduras (Figura 8).

Estas clases de madurez sexual anteriormente mencionadas fueron significativamente diferentes ( $H= 30.42$ ;  $p<0.05$ ;  $gl= 39$ ).



**Figura 9.** Categorías de la madurez sexual de las hembras de *Pristimantis myersi* respecto al tamaño del cuerpo. LCR: Longitud rostro–cloaca. LCR: Longitud rostro–cloaca. (OCDFY: oviducto convoluto delgado y folículos yemados, OCGFY: oviducto convoluto grueso y folículos yemados, ORDFNY: oviducto recto delgado y folículos no yemados).

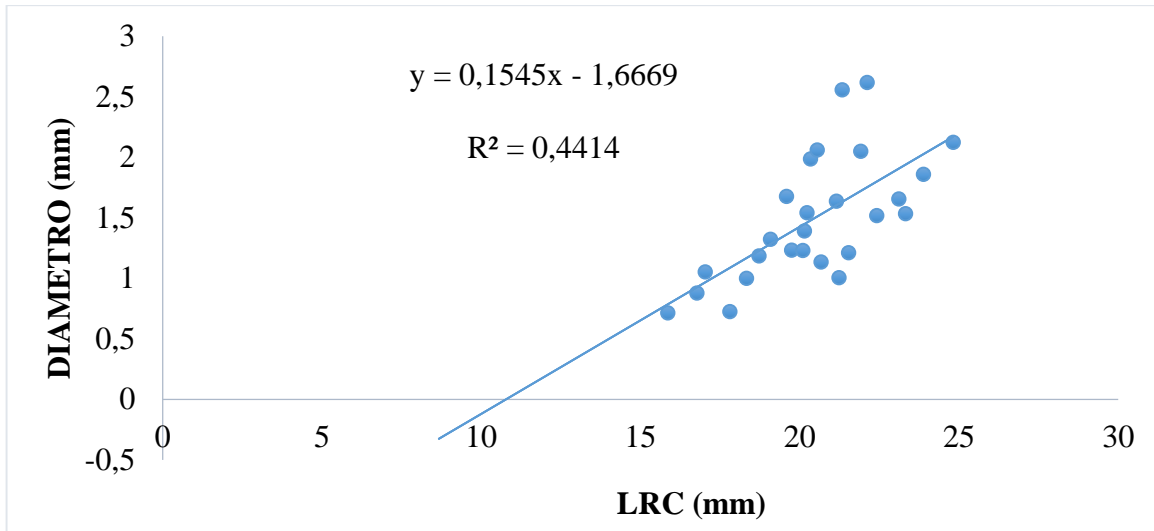
Fuente: este estudio

La prueba de Kruskal-Wallis muestra que hay diferencias significativas entre individuos inmaduros (ORDFNY) y maduros (OCDFY, OCGFY) que se clasificaron de acuerdo al estado de desarrollo de las gónadas y el tamaño del cuerpo, como se pudo observar en el párrafo anterior. En las hembras se observó que los individuos juveniles se agruparon en el intervalo de 10.01 mm a 19.5 mm, con un promedio de 15.05 mm; lo que significa que los ejemplares

encontrados que presenten una LRC dentro de este rango serán hembras juveniles e inmaduras. Por otro lado, las hembras sub-adultas y maduras se agruparon en intervalos de 15.8 mm a 21.2 mm, con un promedio 18.1 mm, por lo cual los ejemplares encontrados que presenten una LRC dentro de este rango serán hembras sub-adultas y maduras. Finalmente, las hembras que presentaron un rango de 19.5 mm a 24.8 mm, con un promedio de 21.4 mm serán hembras adultas y maduras. A partir de 15.8 mm las hembras alcanzaron la madurez sexual.

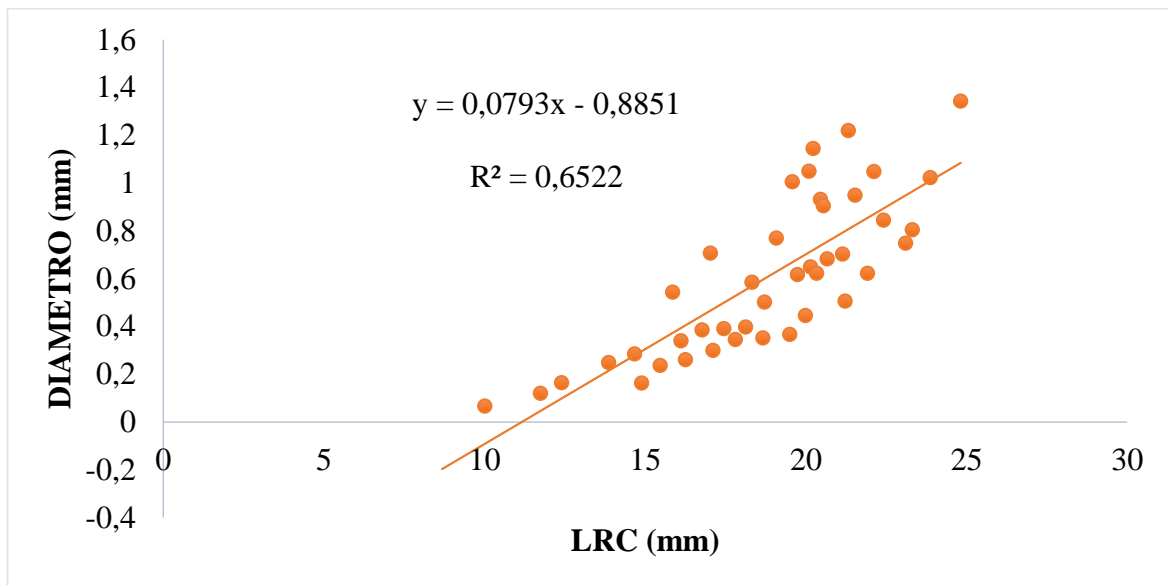
### **7.3.2. Variables reproductivas en hembras de *Pristimantis myersi*.**

El análisis de las variables se obtuvo de un total de 43 hembras. Las variables LRC y diámetro de los folículos presentaron una correlación significativa de **Spearman's** de **0.685** ( $p < 0.05$ ), y un coeficiente de determinación de  **$R^2 = 0,44$**  (Figura 9), indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. De igual manera las variables LRC y diámetro del oviducto presentaron una correlación significativa de **0.834** ( $p < 0.05$ ), y un coeficiente de determinación de  **$R^2 = 0,65$**  (Figura 10); no obstante, el coeficiente de determinación entre estas dos variables presentó un valor más alto con respecto a las variables anteriormente mencionadas. En contraste, las variables LRC y tamaño de la postura presentaron una correlación de **0.413** ( $p\text{-value} = 0.005838$ ), y un coeficiente de determinación bajo  **$R^2 = 0,0021$**  (Figura 11), lo que indica una relación relativamente débil entre estas dos variables.



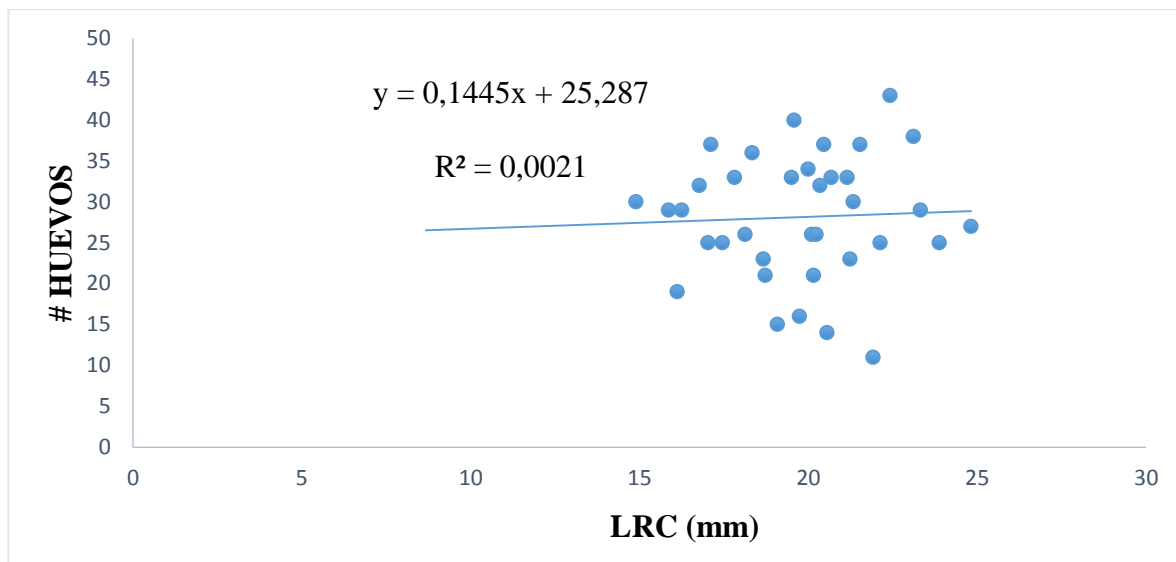
**Figura 10.** Regresión lineal entre la Longitud rostro-cloaca y diámetro de los huevos.

Fuente: este estudio



**Figura 11.** Regresión lineal entre la Longitud rostro-cloaca y diámetro del oviducto.

Fuente: este estudio



**Figura 12.** Regresión lineal entre la Longitud rostro cloaca y numero de folículos.

Fuente: este estudio

### 7.3.3. Determinación de madurez sexual en machos de *Pristimantis myersi*

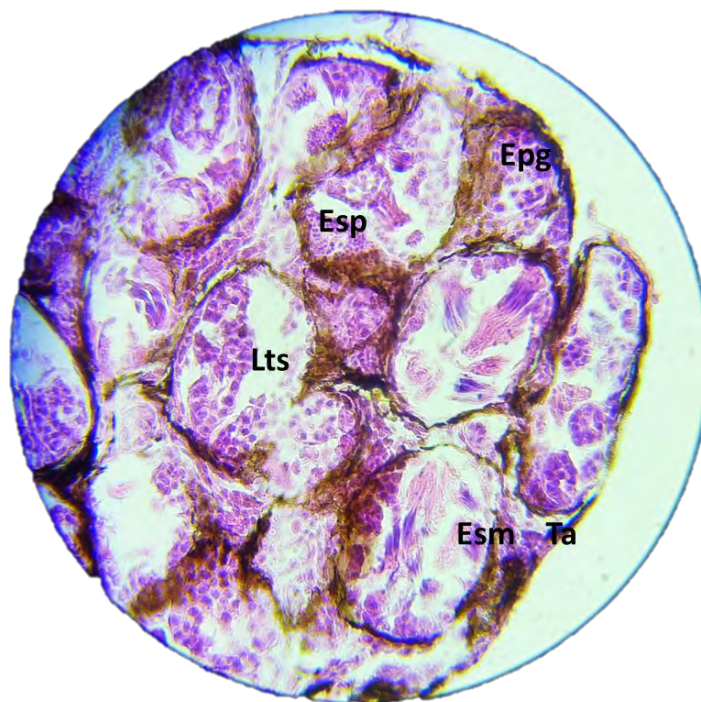
Los testículos de los machos de *Pristimantis myersi* se encuentran cubiertos por una capa de tejido conectivo fibroso (túnica albugínea), la cual penetra desde su posición periférica y envuelve a los numerosos túbulos o también llamados lóbulos seminíferos (Figura 7). El tamaño promedio de los testículos de machos sub-adultos y adultos fue de 1.19 mm de largo y 0.65 mm de ancho en un rango de 11.15 mm a 18.18 mm (LRC) y su volumen testicular vario entre 0.092 mm<sup>3</sup> a 0.915 mm<sup>3</sup> (Tabla 3). A partir de 11.5 mm los machos fueron sexualmente maduros.

**Tabla 3.** Tamaño y volumen de testículos durante la madurez sexual de *Pristimantis myersi*. LRC: Longitud rostro–cloaca

Etiqueta PSO–CZ	LRC (mm)	Tamaño testicular		Volumen testicular
		Largo (mm)	Ancho (mm)	
2820	11,15	1,34	0,52	0,189
2883	11,65	1,26	0,77	0,39

<b>2825</b>	11,77	1,22	0,38	0,092
<b>2890</b>	11,84	1,03	0,8	0,344
<b>2819</b>	12,41	1,18	0,72	0,319
<b>2839</b>	12,65	1,5	0,58	0,263
<b>2829</b>	12,66	1,1	0,61	0,213
<b>2876</b>	12,91	0,8	0,48	0,096
<b>2850</b>	13,28	1,05	0,6	0,197
<b>2807</b>	13,67	1,01	0,68	0,243
<b>2845</b>	13,81	0,98	0,54	0,149
<b>2838</b>	14,03	0,98	0,41	0,086
<b>2874</b>	14,4	1,06	0,6	0,199
<b>2928</b>	14,4	1,2	0,64	0,256
<b>2894</b>	14,82	1,06	0,67	0,248
<b>2933</b>	14,89	1,3	0,81	0,445
<b>2895</b>	15,79	1,54	0,74	0,44
<b>2915</b>	16,14	1,06	0,67	0,248
<b>2917</b>	17,32	1,59	0,92	0,702
<b>2896</b>	18,18	1,62	1,04	0,915

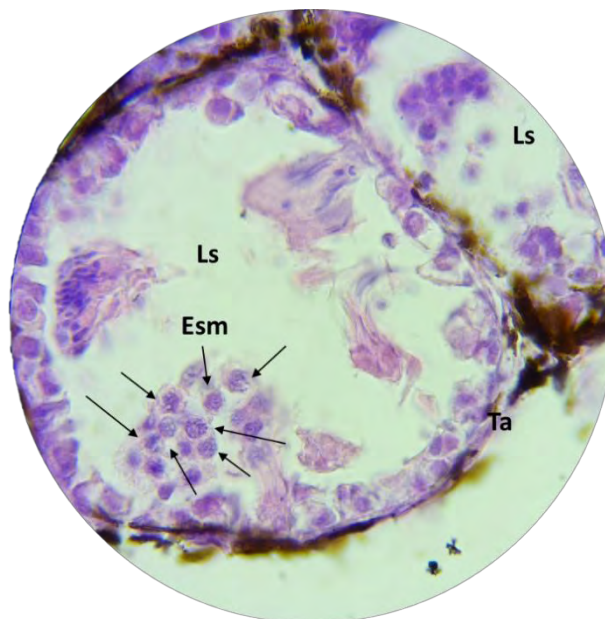
En los cortes histológicos de testículos de *Pristimantis myersi* se observaron dos estados de madurez. Por un lado se encontraron machos adultos en etapa reproductiva, que presentaron todas las etapas de espermatogénesis, es decir, cistos de espermatogonias las cuales se encuentran cercanas a la membrana basal del lóbulo seminífero, caracterizadas por un núcleo irregular y granulaciones cromáticas, espermatocitos representados con células redondas de tamaño menor que las espermatogonias y con diferentes grados de compactación de la cromatina según la fase de división meiótica, las espermatidas que son células redondas y se ubican hacia el centro del lóbulo seminífero y por último los espermatozoides los cuales tenían su núcleo bien compactado observándolos en grupos debido a su asociación con las células de Sertoli (Figura 12). El hecho de encontrar todas las etapas de espermatogénesis confirma que los individuos colectados estaban en plena actividad reproductiva.



**Figura 13.** Fotomicrografía obtenida de cortes de testículos de machos de *Pristimantis myersi*. Macho adulto en actividad reproductiva teñido con hematoxilina-eosina, **Ta**- túnica albugínea, **Epg**- Espermatogonia, **Esp**- espermatoцитos, **Esm**- espermátidas, **Lts**- luz del túbulo seminífero.

Fuente: este estudio

Por otro lado se encontraron pocos machos adultos aún no reproductivos (no en temporada reproductiva) o macho sub-adulto los cuales presentaron pocos cistos de espermátides tardías (Figura 13). En estas etapas se presentan por lo general cistos de espermátides I y espermátides II; sin embargo, en los cortes histológicos no se pudo diferenciar estos dos estadios claramente.



**Figura 14.** Fotomicrografía obtenida de cortes de testículos de machos de *Pristimantis myersi*. Machos adultos aún no reproductivos (no en temporada reproductiva) o macho sub-adulto teñido con hematoxilina-eosina, **Esm**- espermatidas, **Ta**- túnica albugínea, **Ls**- lóbulo.

Fuente: este estudio

## 8. COMPARACIÓN DE LOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LOS GRUPOS

### *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus*.

Hasta el momento son escasos los trabajos sobre la biología reproductiva en las especies pertenecientes a estos grupos. En esta investigación se hace una aproximación sobre la biología reproductiva de una de las especies del grupo *P. myersi*. Solamente se encontró el trabajo de del Pino(1997), en el cual estudian la estructura histológica del ovario del sapo *Eleutherodactylus unistrigatus* (*Pristimantis unistrigatus*) y algunos datos que fueron obtenidos del capítulo “Fenología reproductiva y características de historia de vida de *Pristimantis unistrigatus* (Anura: Strabomantidae) en un gradiente altitudinal de los Andes del suroccidente de Colombia (Cepeda Quilindo, 2014).



**Tabla 4.** Comparación de aspectos reproductivos de *Pristimantis myersi* (grupo *P. myersi*) y *Pristimantis unistrigatus* (grupo *P. unistrigatus*).

	<i>Grupo P. myersi</i>	<i>Grupo P. unistrigatus</i>
<b>Número de especies</b>	17	193
<b>LRC</b>	Tamaños pequeños (♂ 12.0–25.2 mm y ♀ 13.7–33.5 mm)	Tamaño pequeño a mediano (♂ 10.9–42.7 mm y ♀ 10–62.7 mm)
<b>Sistema Reproductor</b>	Ovarios pareados*	Ovarios pareados+
<b>Madurez sexual</b>	19.58 mm a 24.82 mm* (♀) 11.15 mm a 17.32 mm* (♂)	17.2 mm a 34.6 mm (♀) • 17.7 mm a 27.6 mm (♂) •
<b>Tamaño postura</b>	11 a 43 (huevos)*	18 a 58 (huevos)•
<b>Diámetro huevos</b>	0.712 a 2.122 mm*	0.792 mm a 2.428 mm•
<b>Diámetro oviducto</b>	0.067 mm a 1.343 mm*	0.81 mm a 2.86 mm•

**Nota:** Los datos en (\*) son tomados de esta investigación, los datos en (+) fueron sacados de la investigación de del Pino(1997) y los datos en (•) se tomaron de la tesis doctoral en curso de Cepeda Quilindo(2014). Los tamaños de las especies pertenecientes a cada grupo se encuentran presentes en el Anexo 1 y 2 respectivamente.

La especie perteneciente al grupo *Pristimantis myersi* presentó una LRC, diámetro del oviducto y diámetro de huevos pequeños al igual que el tamaño de la postura, a diferencia de la especie del grupo *P. unistrigatus* las cual mostró un tamaño mayor en las variables anteriormente mencionadas. Basado en lo anterior, se pudo determinar que el tamaño (LRC) se relaciona positivamente con el número de huevos, siendo esta una variable que limita el tamaño de la postura en las hembras.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Dimorfismo sexual

El patrón de crecimiento (tamaño vs tiempo) es considerado uno de los factores responsables del dimorfismo sexual en aproximadamente el 90% de las especies de anuros, donde se reconoce que las hembras presentan un mayor tamaño (LRC) respecto a los machos (Shine, 1979; Gramapurohitet *al.*, 2004; Zornosa Torres, 2011). Se han propuesto varias teorías para explicar el dimorfismo sexual, las cuales pueden contribuir a aclarar las diferencias de comportamiento, historias de vida, fisiología, ecología y evolución entre machos y hembras (Howard, 1981; Valdez, 2012). Wells (2007), establece que la causa del dimorfismo sexual en el tamaño es producto de la selección natural y hace referencia a las características distintivas entre machos y hembras de una misma especie. Por otro lado McNamara (2012) señala que el dimorfismo sexual entre machos y hembras se da por las diferencias en el tamaño y la forma, lo cual está regulado por genes de desarrollo denominados heterocrónicos. La diferencia en los tamaños depende de procesos asociados al desarrollo como la variación en el tiempo del cese de crecimiento, variación en el tiempo de inicio de crecimiento y el cambio en la tasa de crecimiento que afectan el tamaño final del individuo (Alberch, Gould, Oster, & Wake, 1979).

Por otra parte, Howard (1981), demostró que las hembras se asocian preferentemente con machos grandes, por lo que la elección por parte de la hembra también puede desempeñar un papel en la evolución del dimorfismo sexual. Sin embargo, una explicación sobre el tamaño pequeño que alcanzan los machos en algunas especies los discute Shine(1979), donde explica que los machos están limitados por ciertas restricciones fisiológicas (temperaturas) y funcionales (tamaño); es decir, que probablemente sea ventajoso que los individuos sean pequeños para

reducir el gasto de energía para el mantenimiento del cuerpo. Asimismo, los machos sufren una mayor mortalidad que las hembras, debido a que estos adoptan estrategias de riesgos (cantos) que los hacen más susceptibles a los depredadores (Trivers, 1972).

Basado en los supuestos anteriormente mencionados, no se puede afirmar que en los individuos de *Pristimantis myersi* exista un marcado dimorfismo sexual, ya que para llegar a este tipo de conclusiones es necesario realizar investigaciones en diferentes condiciones ambientales en donde se incluyan individuos desde etapas iniciales (larvales y embrionarias), juveniles hasta adultas, enfocándose especialmente en los periodos reproductivos, con el fin de determinar los cambios en el tamaño y las tasas de supervivencia a lo largo del tiempo.

## **9.2. Descripción del sistema reproductor**

En particular la anatomía del sistema reproductor observado para *Pristimantis myersi* es similar a la anatomía presentada por la mayoría de las especies de Anuros (Duellman & Trueb, 1986; Duellman & Lehr, 2009).

En el caso en las hembras de *P. myersi* se pudo observar claramente una relación entre el oviducto y el estado de desarrollo, es decir, las hembras maduras presentan oviductos convolutos gruesos (Figura 5D) en relación a los oviductos de las hembras inmaduras, las cuales presentan oviductos rectos y delgados (5B). Esto también es observado en los trabajos de Zornosa Torres (2011) en individuos de *Dendropsophus columbianus* y Valderrama-Vernaza *et al.* (2010) en individuos de *Ranitomeya virolinensis*. En algunas especies de lagartos como es el caso de *Liolaemus multicolor* y *Liolaemus irregularis* también se puede observar esta relación (Valdecantos, Lobo, & Martínez, 2007).

Por otra parte los machos presentan una pigmentación en las gónadas (Figura 6), esta característica particular de algunas especies puede ser confundida al momento de determinar la madurez sexual, ya que algunas solo presentan esta pigmentación en la época reproductiva (Duellman & Trueb, 1986; Zornosa Torres, 2011). Sin embargo, Franco Belussi *et al.* (2009) citado por Zornosa Torres(2011), atribuyen la pigmentación testicular a unas células pigmentadas que producen y almacenan melanina en órganos como los testículos, y afirman que estas variaciones en la pigmentación no están asociadas con el tamaño corporal del individuo ni con su madurez sexual. En este sentido, la pigmentación de los testículos presentada por los machos reproductivos y no reproductivos de *Pristimantis myersi* se asocia a la madurez sexual, ya que se pudo observar mediante los cortes histológicos que machos que presentaban esta característica fueron sexualmente reproductivos o al menos estaban entrando a etapa reproductiva (Figura 7A), rechazando de alguna manera el supuesto de Franco Belussi *et al.*(2009).

Por otro lado, los cuerpos grasos se encuentran presentes en el aparato reproductor femenino como masculino de *Pristimantis myersi* (Figura 5A y 7C), tanto en individuos maduros como inmaduros. Estas estructuras sirven como fuente de nutrición para las gónadas de machos y hembras, sin embargo la diferencia en los cuerpos grasos entre machos y hembras se debe al hecho de que la espermatogénesis es menos costosa que la ovogénesis (Iturriaga, Sanz, & Oliva, 2014), por lo cual estos están presentes en mayor cantidad e intensidad (color) en hembras maduras (Duellman & Trueb, 1986; Iturriaga *et al.*, 2014) como se puede observar en los resultados de este trabajo. Otra de las razones por la cual se presentan en mayor cantidad en las hembras, es por el hecho de que los huevos necesitan de un suplemento nutricional adecuado

para alcanzar el tamaño conveniente (Duellman & Trueb, 1986; Antoniazzi, Ghirardi, López, & Armando, 2014).

### 9.3. Madurez sexual

La maduración sexual es una transición crítica en la historia de la vida de cualquier organismo y se considera dentro de los aspectos más importantes para la supervivencia de una especie (Duellman & Trueb, 1986; Gramapurohitet *al.*, 2004). La madurez sexual depende de la edad y del tamaño (LRC) (Valdecantoset *al.*, 2007). Bernardo(1993) destaca que la edad en que las especies alcanzan la madurez sexual es controlada genéticamente, pero también existen distintos factores ambientales que influyen en la estructura de edades de los individuos; por otro lado, Hartel *et al.*(2007) establece que una vez alcanzado un tamaño adecuado en una edad avanzada, el crecimiento se frena con el fin de que los recursos que fueron adquiridos sean invertidos en la producción de huevos, un proceso que requiere de mucha energía.

Las hembras de *Pristimantis myersi*, alcanzaron una madurez en etapas sub-adultas y adultas, posiblemente las diferencias en el tamaño están asociadas a la influencia del medio en el cual se desarrolló y crecieron los individuos.

Con base en las medidas en el anexo 1, se evidencia que *P. myersi* es en general una especie de tamaño pequeño, ya que de acuerdo con los rasgos descritos por Hedgeset *al.*(2008) las especies que se encuentran en el grupo *P. myersi* se caracterizan por presentar estos tamaños, asimismo, en la descripción realizada por Rojas Runjaic & Guayasamin(2015), se considera como una rana pequeña de aproximadamente 17.5 mm (♂) y 23.2 (♀). Aunque, es pequeña en comparación con las especies que se encuentran en el grupo *P. unistrigatus* las cuales se caracterizan por presentar tamaños corporales mucho más grandes (anexo 2) (Hedgeset *al.*,2008).

Una posible hipótesis que explica por qué los individuos maduran a una etapa más temprana con un LRC pequeña, puede ser la mencionada por Augert & Joly(1993), donde las ranas más pequeñas pueden tener una tasa de crecimiento lo suficientemente rápida como para hacer posible su maduración temprana. Sin embargo Kozłowski & Uchmanski(2002), señalan que un menor tamaño del cuerpo y una maduración más temprana también pueden promoverse por la escasez de recursos.

Por otro lado, se encontró una relación positiva entre las variables LRC–diámetro de huevos y LRC–diámetro del oviducto. Esta relación significativa ha sido encontrada en la mayoría de los anuros, donde hay una asociación positiva entre estas variables (Duellman & Trueb, 1986). Varios estudios como los de Castellano *et al.*(2004); Camargo *et al.* (2005); Haddad & Prado (2005); Camargo *et al.* (2008) y Iturriaga *et al.*(2014) han demostrado que el tamaño (LRC) limita el alojamiento de los huevos; por lo tanto, las hembras con mayor tamaño tienen una capacidad superior para producir y albergar mayor cantidad de huevos en relación a las hembras pequeñas las cuales aún deben invertir en su crecimiento.

Sin embargo, la relación entre LRC y la variable número de huevos fue débil, aparentemente estas variables no tienen relación y la cantidad y el tamaño de los huevos se deba a un atributo propio de la especie o del modo reproductivo, como lo señala Crump (1974), Duellman & Trueb(1986) y Morrison & Hero (2003); es decir, a pesar de que exista un mayor espacio en hembras grandes, el número de huevos no aumentará considerablemente y en ese caso, para ocupar el espacio, los huevos incrementaran el tamaño. Así mismo, es probable que esta variación en el tamaño de los huevos producidos por un individuo o por una especie, pueda estar sujeto al estricto control genético en respuesta adaptativa a los cambios en ambientes fluctuantes (Guayara Barragán & Bernal, 2012).

Según los modos reproductivos que dan a conocer Duellman & Trueb(1986) y Jamieson(2003), *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* presentan un modo reproductivo terrestre (desarrollo directo), el cual se caracteriza por posturas bajo hojarasca, sobre la hojarasca y lejos de cuerpos de agua. Sin embargo, para llegar a este tipo de afirmaciones es necesario realizar una fase de campo donde se logre observar en qué sitio las hembras hacen sus posturas y el número de huevos en cada oviposición.

Por otra parte, la estructura histológica general del testículo observada en machos de *Pristimantis myersi* muestra una gran similitud con las descripciones de algunas especies del orden Anura (Duellman & Trueb, 1986) y de la familia Eleutherodactylidae (Rodríguez Gómez *et al.*, 2012; Guíllama *et al.*, 2014; Pacheco Florez & Ramírez Pinilla, 2014).

Todos los machos analizados en este trabajo mostraron una gran actividad espermatogénica que evidencia un estado de madurez sexual. Sin embargo, no se pudo evidenciar claramente todos los tipos celulares de la espermatogénesis debido a que las muestras utilizadas no estaban en las condiciones adecuadas para realizar cortes histológicos. Asenjo *et al.*(2011), sugieren que para realizar análisis histológicos se debería trabajar con material recién colectado, debido a que los detalles en la morfología de los espermatozoides puede ser utilizado como caracteres en filogenias y pueden ayudar a determinar especies o grupos de especie.

El estado juvenil en machos de *P. myersi* no se pudo observar, ya que todos los individuos analizados en este trabajo presentaron alguna etapa de espermatogénesis.

## 10. COMPARACIÓN DE LOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LOS GRUPOS *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus*.

La separación de los grupos de *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus*, se ha basado en caracteres morfológicos y moleculares (Lynch, 1981; Hedges *et al.*, 2007; Padial *et al.*, 2014; Heinicke *et al.*, 2018). El grupo de especies *P. myersi* se definen por presentar un cuerpo pequeño con un tamaño promedio de 28 mm (Anexo 1), el dedo V más corto que el dedo III, presencia de hendiduras vocales y un saco vocal interno, carencia de pliegues dorsolaterales, discos digitales estrechos entre otras características que son propias de las especies de este grupo; mientras que, las especies del grupo de *P. unistrigatus* se distinguen por tener tamaños medianos con promedio aproximado de 45 mm (Anexo 2), el dedo I es más corto que el dedo II, la punta del dedo V es más larga que el dedo III y se extiende hasta el borde del tubérculo subarticular del dedo IV, discos digitales expandidos, anillo timpánico y membrana timpánica.

Los anteriores caracteres morfológicos se han usado en el diagnóstico de las especies de cada grupo; sin embargo, Asenjo *et al.* (2011), sugiere que análisis histológicos de estructuras internas pueden ser utilizadas en filogenias y ayudar a determinar especies o grupos de especies, de igual manera, las características ultra-estructurales de los espermatozoides proporcionan una fuerte evidencia de una señal filogenética que podría usarse para resolver preguntas importantes en la sistemática de los anuros (Santos *et al.* 2016).

En este estudio no se observaron diferencias en las estructuras internas como ovarios pareados, tamaño y forma del oviducto ni en los cortes histológicos entre las especies del grupo de *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* (Anexo 3). En cambio se observó una variación en el tamaño de la postura de estos dos grupos, por lo cual se sugiere que esta



característica podría ser empleada para diferenciar cada grupo de especies, sin embargo es necesario complementar con descripciones de procesos oogénicos (estadio de los huevos).

## CONCLUSIONES

Las especies *Pristimantis myersi* y *Pristimantis unistrigatus* presentaron un dimorfismo sexual marcado en los tamaños corporales, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos. Las hembras juveniles se caracterizaron por presentar oviducto recto y folículos no yemados, las hembras sub-adultas por presentar oviducto convoluto delgado y folículos yemados y las hembras adultas por presentar oviducto convoluto grueso y folículos yemados. Para el caso de los machos no se pudo establecer el tamaño de la madurez sexual, dado que todos los individuos estudiados estuvieron en etapa reproductiva, independientemente de su tamaño (adulto, sub-adulto).

La morfología testicular de *Pristimantis myersi* es similar a la de otros anuras con desarrollo directo. Los machos presentan una espermatogénesis por cistos (Cística). Todos los ejemplares colectados se encontraban en estado reproductivo al menos por presentar algunas etapas de la espermatogénesis.

Información sobre la biología reproductiva (morfología, modos reproductivos y aspectos de comportamiento) poseen un relevante valor biológico y puede ser utilizada para corroborar filogenias como lo siguieren algunos autores.

Las variables tamaño de la postura, diámetro de huevos y diámetro de oviductos analizados en esta investigación, permiten establecer el estado de madurez en la que se encuentran las hembras. Los aspectos reproductivos encontrado para las especies del grupo de *Pristimantis myersi* difieren del grupo de especie de *Pristimantis unistrigatus*.

### RECOMENDACIONES

Para el estudio de cortes histológicos se recomienda trabajar con material recién colectado, debido a que el material que se encuentra preservado durante mucho tiempo puede sufrir algunos daños en los tejidos. Además se recomienda que el material colectado sea conservado en formol Bufferado un fijador de tejidos recomendado para microscopia de luz.

Para completar este estudio sobre la biología reproductiva de *Pristimantis myersi* sería interesante realizar trabajo de campo, donde se pueda identificar el periodo reproductivo, mediante muestreos durante todo el año, observación de amplexos y observación de posturas. Por otra parte, sería necesario analizar la variación en la composición de la dieta, ya que muchos autores determinan que la capacidad de la hembra puede verse limitada por el volumen ocupado por el estómago y el resto del tubo digestivo.

Para los análisis filogenéticos se recomienda hacer estudios sobre la ultra-estructura de los espermatozoides ya que estos proporcionan una fuerte evidencia que podría usarse para resolver preguntas importantes en la sistemática de los anuros

## REFERENCIAS

- Acosta Galvis, A. R. (14 de 03 de 2017). *Lista de los Anfibios de Colombia*. Obtenido de Lista de los Anfibios de Colombia: <https://www.batrachia.com/>
- Alberch, P., Gould, S. J., Oster, G. F., & Wake, D. B. (1979). Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Volume 5, Issue 3 Summer 1979*, pp. 296-317, 296-317.
- Antoniazzi, C. E., Ghirardi, R., López, J. A., & Armando, A. P. (2014). Parámetros reproductivos de *Hypsiboas punctatus* (Schneider 1799) (Anura: Hylidae) en el extremo sur de su área de distribución. *Revista Peruana de Biología*, 20(3): 241-244, 241-244.
- Arroyo, S. B., Serrano Cardozo, V. H., & Ramírez Pinilla, M. P. (2008). Diet, microhabitat and time of activity in a *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) assemblage. *Phyllomedusa* 7(2):109-119, 109-119.
- Asenjo, A., Siu Ting, K., & Pino, J. (2011). Morfometría de testículos y células germinales de *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Dendrobatidae: Anura: Amphibia). *The Biologist (Lima)*, 9 (2): 167-175, 167-175.
- Attademo, A. M. (2010). Diversidad de anfibios (Amphibia: Anura) en cultivos de soja de la República Argentina: implicaciones en el control biológico de plagas. Buenos Aires , Argentina .

- Augert, D., & Joly, P. (1993). Plasticity of age at maturity between two neighbouring populations of the common frog (*Rana temporaria* L.). *Canadian Journal of Zoology*, 71(1): pag. 26-33, 26-33.
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2005). Ecology : from individuals to ecosystems. En Begon, Michael. México : Blackwell Publishers 738 p Edición ; 4th ed.
- Bernardo, J. (1993). Determinants of maturation in animals. *Trends in Ecology & Evolution*, Volume 8, Issue 5, Pages 166-173, 166-173.
- Bertoluci, J., & Rodrigues, M. T. (2002). Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 23: 161-167, 161-167.
- 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* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. *Ann. Zool. Fennici* 42: 513-521, 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 Volume 34, Issue 2, September–October 2008, Pages 163-171*, 163-170.
- Carezzano, F. J., Dorflinger, K., Alonso, M., & Urquiza Bardone, S. P. (2015). Morfohistología testicular de *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia, Hylidae) durante la estación Reproductiva. *Acta biológica Colombiana*, 20(1):225-228, 225-228.
- Carezzano, F., Urquiza, S., Dorflinger, K., & Alonso, M. (2013). Morfohistología testicular de *Ceratophrys ornata* (Bell) (Amphibia, Anura, Ceratophryidae). *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre*, 103(2):190-194, 190-194.

- Castellano, S., Cucco, M., & Giacoma, C. (2004). Reproductive Investment of Female Green Toads (*Bufo viridis*). *Copeia Vol. 2004, Issue 3, pag. 659- 664, 659-664.*
- Castro, F., Herrera, M. I., & Lynch, J. D. (2004). *Pristimantis myersi*. Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/details/56781/0>
- Cepeda Quilindo, B. (2014). Fenología reproductiva y características de historia de vida de *Pristimantis unistrigatus* (Anura: Craugastoridae) en un gradiente altitudinal de los andes del suroccidente de Colombia. Bogotá, Colombia.: (Tesis de doctorado en ciencias biológicas de la Universidad Nacional de Colombia, en proceso).
- Christiansen, J. L., & Burken, R. R. (1979). Growth and maturity of the Snapping Turtle (*Chelydra serpentina*) in Iowa. *Herpetologica, Vol. 35, No. 3 (Sep., 1979), pp. 261-266, 261-266.*
- Coloma, L. A., Ron, S., Rodríguez, L., & Martínez, J. (2010a). *Pristimantis myersi*. Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/details/56781/0>
- Coloma, L. A., Ron, S., Rodríguez, L., Martínez, J. L., Yáñez Muñoz, M., & Almendáriz, A. (2010b). *Pristimantis unistrigatus*. Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/details/57024/0>
- Crump, M. L. (1974). Reproductive Strategies in a Tropical Anuran Community. *Lawrence, Kansas 66045, pp. 1-68, 4-59.*
- Crump, M. L. (2015). Anuran Reproductive Modes: Evolving Perspectives. *Journal of Herpetology 49(1):1-16., 1-16.*
- D'Ancona, H. (1960). Tratado de zoología. Zoología general. *Madrid (España). Editorial Labor. 1960. t.1; 428 p., 1-100.*

- del Pino, E. M. (1997). Estructura histológica del ovario del sapo *Eleutherodactylus unistrigatus* y observaciones sobre el desarrollo embrionario. Ecuador : Editorial "Don Bosco", Quito - Ecuador.
- Donnelly, M. A. (1999). Reproductive Phenology of *Eleutherodactylus bransfordii* in Northeastern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, Vol. 33, No. 4 (Dec., 1999), pp. 624-631, 624-631.
- Duellman, W. E. (1988). Patterns of species diversity in Anuran Amphibians in the American Tropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 75, No. 1, pp. 79-104, 79-104.
- Duellman, W. E. (1988). Patterns of Species Diversity in Anuran Amphibians in the American Tropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 75, No. 1, pp. 79-104, 79-104.
- Duellman, W. E., & Lehr, E. (2009). *Terrestrial-Breeding Frogs (Strabomantidae) in Peru*. Peru: Natur und Tier - Verlag GmbH, pag. 5-376.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1986). *Biology of amphibians*. USA: The Johns Hopkins University Press, Book. pag 670.
- Elgue, E. (2013). Biología reproductiva de una población de *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Meneville, 1838) (Anura, Microhylidae). (Tesina para optar por el grado de licenciatura en ciencias biológicas), Universidad de la Republica de Uruguay, Uruguay.
- Franco Belussi, L., Zieri, R., De Souza Santos, L. R., Moresco, R. M., & De Oliveira, C. (2009). Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation . *The Anatomical Record* 292:178–182, 178-182.
- Frost, D. R. (15 de 02 de 2018). *Amphibian Species of the World*. Obtenido de Amphibian Species of the World: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>

- González Durán, G. A., Targino, M., Rada, M., & Grant, T. (2017). Phylogenetic relationships and morphology of the *Pristimantis leptolophus* species group (Amphibia: Anura: Brachycephaloidea), with the recognition of a new species group in *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870. *Zootaxa* 4243 (1): 042–074, 42-74.
- Gramapurohit, N. P., Shanbhag, B. A., & Saidapur, S. K. (2004). Growth, sexual maturation and body size dimorphism in the indian bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (DAUD). *Herpetologica* 60(4):414-419., 414-419.
- Grosjean, S., Delorme, M., Dubois, A., & Ohler, A. (2008). Evolution of reproduction in the Rhacophoridae (Amphibia, Anura). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* Volume 46, Issue 2, Pages 169–176, 169-176.
- Guayara Barragán, M. G., & Bernal, M. H. (2012). Fecundidad y fertilidad en once especies de anuros colombianos con diferentes modos reproductivos. *Caldasia*, Vol. 34, No. 2, pp. 483-496, 483-496.
- Guillama, L. C., Reyes, Y., Ochotorena, A. S., Lara, R., Segura, M. L., & Jiménez, L. F. (2014). Descripción morfológica de gónadas y células sexuales de dos especies de ranas cubanas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae). *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, Vol. 3, No 3, pag. 38-47, 38-47.
- Haddad, C. F., & Prado, C. P. (2005). Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, Volume 55, Issue 3, 1 March 2005, Pages 207–217., 207-217.

- Hartel, T., Sas, I., Pernetta, A. P., & Geltsch, I. C. (2007). The reproductive dynamics of temperate amphibians: a review. *North-Western Journal of Zoology, volumen, numero 1, pag. 127-145*, 127-145.
- Hedges, S. B., Duellman, W. E., & Heinicke, M. P. (2008). New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa 1737: 1–182*, 125-127.
- Heinicke, M. P., Duellman, W. E., & Hedges, S. B. (2007). Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (24) 10092-10097*, 10092-10097.
- Heinicke, M. P., Duellman, W. E., Trueb, L., Means, D. B., MacCulloch, R. D., & Hedges, S. B. (2009). A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa 2211: 1–35*, 1-31.
- Heinicke, M. P., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., McGrath, K., & Hedges, S. B. (2018). Phylogenomic support for evolutionary relationships of New World direct-developing frogs (Anura: Terraranae). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 118 (2018) 145–155*, 145-155.
- Howard, R. D. (1981). Sexual dimorphism in bullfrogs. *Ecology, Volume 62, Issue 2, Pages 303–310*, 303-310.
- Hunter, A. S., & de Valdivieso, B. M. (1962). La Reproduccion de la rana, *Hyla labialis*. *Caldasia Vol. 8, No. 40 (ENERO 20 DE 1962), pp. 573-583*, 573-583.



- Hutter, C. R., Liu, V., Kell, T., Lyons, J. A., & Guayasamin, J. M. (2016). The Natural History, Distribution, and Conservation of Lonely Rainfrogs, *Pristimantis eremitus*. *Herpetologica*, 72(1):13-22., 13-22.
- Iturriaga, M., Sanz, A., & Oliva, R. (2014). Seasonal Reproduction of the Greenhouse Frog *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Eleutherodactylidae) in Havana, Cuba. *South American Journal of Herpetology*, 9(2):142-150, 142-150.
- Jameson, D. L. (1957). Life history and phylogeny. *Systematic Zoology*, Vol 6: pag. 75-80, 75-80.
- Jamieson, B. M. (2003). Reproductive Biology and Phylogeny of Anura. *Science Publishers, Inc*, pag. 319-341, 319-341.
- Klemming, J. M. (2002). La evolución de estrategias vitales. *Evolución: la base de la biología* ISBN 84-8254-139-0, págs. 159-176, 159-176.
- Kozłowski, J., & Uchmanski, J. (2002). Optimal individual growth and reproduction in perennial species with indeterminate growth. *Evolutionary Ecology*, Volume 1, Issue 3, pp 214–230, 214-230.
- Lima, A. P., & Keller, C. (2003). Reproductive Characteristics of *Colostethus marchesianus* from its type locality in Amazonas, Brazil. *Journal of Herpetology*, Vol. 37 No. 4, pp. 754-757, 754-757.
- López Noguera, M. (2015). Actividad minera en el Choco Biogeografico y su impacto en Anfibios.Colombia : Universidad Militar Nueva Granada.
- Lynch, J. D. (1971). Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs. *Miscellaneous publication 53*, pp 1-238, 1-238.

- Lynch, J. D. (1981). Leptodactylid Frogs of the Genus *Eleutherodactylus* in the Andes of Northern Ecuador and Adjacent Colombia. USA: Lawrence, Kansas 66045, USA, pp. 1-46.
- Lynch, J. D. (1986). The definition of the middle American Clade of *Eleutherodactylus* based on jaw musculature (Amphibia: Leptodactylidae). *Herpetologica*, Vol. 42, No. 2, pp. 248-258, 248-258.
- Lynch, J. D., & Duellman, W. E. (1997). Frogs of the Genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in Western Ecuador: Systematics, Ecology, and Biogeography. En L. Trueb, *Eleutherodactylus (Leptodactylidae) in Western Ecuador: Systematics, Ecology, and Biogeography* (págs. 1-41). USA: Lawrence, Kansas 66045, USA, pp. i-iv, 1-236.
- Lynch, J. D., & Suárez Mayorga, Á. M. (2002). Análisis biogeográfico de los anfibios paramunos. *Caldasia* 24(2): 471-480, 471-480.
- Martori, R., Aun, L., Birri, A., Rozzi Giménez, C., & Heredia, E. (2005). Reproducción comparada de tres especies de anuros sintópicos de una localidad del sudeste de Córdoba. *Cuadernos de Herpetología, Volumen 18, Número 02, pag. 43-59*, 43-59.
- McNamara, K. J. (2012). Heterochrony: the Evolution of Development. *Evolution: Education and Outreach, Volume 5, Issue 2, pp 203–218*, 203-218.
- Miaud, C., Guyétant, R., & Elmberg, J. (1999). Variations in life-history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. *Journal of Zoology, Volume 249, Issue 1, pp. 61-73*, 61-73.
- Morales, E. (1988). Estrategias de ciclo de vida; Diferentes enfoques para entender las adaptaciones de los organismos. *Ciencias Revista de difusión, pag:37-43*, 37-43.

- Morrison, C., & Hero, J. M. (2003). Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology* (2003) 72, 270–279, 270-278.
- Mueses Cisneros, J. J. (2005). Fauna Anfibia del Valle de Sibundoy, Putumayo-Colombia. *Caldasia* 27(2):229-242., 229-242.
- Ortega, J. E., Serrano, V. H., & Ramírez Pinilla, M. P. (2005). Reproduction of an Introduced Population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. *Copeia* 2005(3):642-648., 642-648.
- Ortegón Tolosa , Y. L. (2014). Madurez y dimorfismo sexual de la ranita cohete *Colostethus aff fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae) en una población al este de la cordillera central de Colombia. (Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de biólogo), Universidad del Tolima, Ibagué.
- Ospina Sarria, J. J. (2012). Revisión morfológica de las ranas del género *Strabomantis* (Anura: Brachycephalidae sensu Frost et al. 2006). (Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias, Biología), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pacheco Florez, V., & Ramírez Pinilla, M. P. (2014). Ecología reproductiva de *Geobatrachus walkeri* (Anura: Strabomantidae) . *Revista de Biología Tropical Vol. 62 (1): 183-199*, 183-199.
- Padial, J. M., Grant, T., & Frost, D. R. (2014). Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825 (1): 001–132, 122-126.

- Perotti, M. G. (1997). Modos reproductivos y variables reproductivas cuantitativas de un ensamble de anuros del Chaco semiárido, Salta, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 1997, 70: 277-288, , 277-288.
- 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 (2011) 543–583, 543-580.
- Reyes-Puig, J. P., Yáñez Muñoz, M. H., Cisneros Heredi, D. F., & Ramírez, S. (2010). Una nueva especie de rana *Pristimantis* (Terrarana: Strabomantidae) de los bosques nublados de la cuenca alta del río Pastaza, Ecuador. *Avances en Ciencias e Ingenierías 2010*, Vol. 2, No. 3, Pags. B78-B82, 78-81.
- Rice, K. G., Mazzotti, F. J., Waddle, J. H., & Conill, M. D. (2006). Uso de anfibios como indicadores del éxito de la eestauración de Ecosistemas. *Universidad de la Florida. Wildlife Ecology and Conservation CIR 1484S*, pag 5, 1-5.
- Rincón Franco, F., & Castro Herrera, F. (1998). Aspectos Ecologicos de una comunidad de *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) en un bosque de niebla del Occidente de Colombia. *Caldasia*, Vol. 20, No. 2, pp. 193-202, 193-202.
- Rodrigues, D. J., Uetanabaro, M., & Lopes , F. S. (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* (2004) 18:63-73, 63-73.
- Rodríguez Gómez, Y., Sanz Ochotorena, A., Segura Valdés, M. L., Martínez, R. L., & Jiménez García, L. F. (2012). Diferencias en la morfología testicular en ranas del género

- Eleutherodactylus* (Anura) pertenecientes a tres microhábitats. *Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas*, (págs. 1-10).
- Rojas Runjaic, F. J., & Guayasamin, J. M. (2015). First record of the rain frog *Pristimantis myersi* (Goin & Cochran, 1963) (Anura, Craugastoridae) for Ecuador. *Check List 11(1): 1542, January 2015, Volume 11, Number 1, Article 1542, pag. 1-4, 1-4.*
- Ron, S. R., Frenkel, C., Varela Jaramillo, A., & Guayasamin, J. M. (2015). *Pristimantis unistrigatus*. Obtenido de Anfibios del Ecuador. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20unistrigatus>
- Saidapur, S. K. (1983). Patterns of testicular activity in Indian amphibians. *Indian Review of Life Sciences, 3, 157-184, 157-184.*
- Salgado Negret, B. (2015). La Ecología Funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones. Bogota: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia. 236 pp.
- Salthe, S. N., & Duellman, W. E. (1973). Quantitative constraints associated with reproductive mode in anurans. In *Evolutionary Biology of the Anuras. James L. Vial (ed. ). Univ Miss. Press. Columbia, Missouri: 229-249, 229-249.*
- Salthe, S. N., & Mecham, J. S. (1974). Reproductive and courtship patterns. En B. Lofts, *Physiology of the Amphibia* (págs. 309-521). Academic press, INC, 1-591.
- Santos, J. S., Introíni, G. O., Veiga Menoncello, A. P., Blasco, A., Rivera, M., & Recco Pimentel, S. M. (2016). Comparative sperm ultrastructure of twelve leptodactylid frog

- species with insights into their phylogenetic relationships. *Micron*, Volume 91, Pages 1-10, 1-16.
- Sanz Ochotorena, A., Rodríguez Gómez, Y., Segura Valdez, M. L., Lara Martínez, R., & Jiménez García, L. F. (2014). Morfología testicular de dos sapos pequeños, amenazados y endémicos de cuba *Celtophryne gundalchii* y *P.cataulaciceps* . *2do Congreso virtual de Ciencias Morfológicas*, (pág. 11). Cuba.
- Shine, R. (1979). Selection and Sexual Dimorphism in the Amphibia. *Copeia*, Volumen No. 2, pp. 297-306, 297-306.
- Solarte, M. E., Armero, M., Narváez, G., Ortíz, E., Salas, V. F., & Leonel, H. F. (2015). *Estudio Técnico, Económico, Social y Ambiental para la identificación y delimitación a escala 1:100.000 del complejo de páramos la Cocha-Patascoy*. San Juan de Pasto: Convenio de cooperación No. 14-13-014-116CE Instituto Humbolt - Universidad de Nariño.
- Trivers, R. L. (1972). Parental Investment and Sexual Selection. En B. Campbell, *Sexual selection and the descent of man 1871-1971* (págs. 136-150). Chicago: Aldine publishing company, pag. 1-207.
- Valdecantos, S., Lobo, F., & Martinez, V. (2007). Estimación de edades, tamaño corporal y adquisición de la madurez sexual en dos especies de *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae). *Cuadernos de Herpetología*, Volumen 21, Número 01, p. 31-44, 31-44.
- Valderrama Vernaza, M., Serrano Cardozo, V. H., & Ramírez Pinilla, M. P. (2010). Reproductive Activity of the Andean Frog *Ranitomeya virolinensis* (Anura: Dendrobatidae). *Copeia* 2010(2):211-217, 211-217.

- Valdez, V. (2012). Biología Reproductiva de una población uruguaya de *Odontophrynus americanus* (Duméril & Bibron, 1841) (Anura, Cycloramphidae). (Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas), Universidad de la Republica de Uruguay, Uruguay.
- Varela Jaramillo, A., & Páez Rosales, N. (2017). *Pristimantis myersi* . Obtenido de Anfibios del Ecuador. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. :  
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20myersi>
- Watling, J. I., & Donnelly, M. A. (2002). Seasonal patterns of reproduction and abundance of leaf litter frogs in a Central American rainforest. *Journal of Zoology Volume 258, Issue 2 October 2002* , pp. 269-276, 269-276.
- Wells, K. D. (1997). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour, Volume 25, Pages 666-693*, 666-693.
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago 60637, pag 1-855.
- Yáñez Muñoz, M. H., & Bejarano Muñoz, E. P. (2013). Lista actualizada de ranas terrestres *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) en las Estribaciones Occidentales del Distrito Metropolitano de Quito, Andes de Ecuador. *Boletín Técnico 11, Serie Zoológica 8-9: 125-150*, 125-148.
- Zornosa Torres, C. I. (2011). Relación entre el tamaño corporal y los estados de madurez sexual en *Dendropsophus columbianus* (Anura, Hylidae) colectados en la cuenca del Río La Vieja (Quindío, Colombia) y preservados en el Museo de Historia Natural de la Pontificia

Universidad Javerin. (Tesis pregrado, obtencion título de Biólogo), Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

Zug, G., Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2001). Herpetology: An introductory biology of Amphibians and Reptiles. USA: Academic Press, pag. 645.



## 14. ANEXOS

**Anexo 1.** Tamaños mínimos y máximos (LRC) de las especies del grupo *Pristimantis myersi*.

Especies grupo <i>Pristimantis myersi</i>					
Taxón	SVL ♂		SVL ♀		Referencia Bibliográfica
	Min	Max	Min	Max	
<i>Pristimantis bicantus</i>	12 mm	15,8 mm	17,0 mm	21,7 mm	Guayasamin & Funk, 2009
<i>Pristimantis festae</i>	14,4 mm	21,3 mm	17,3 mm	25,5 mm	Lynch y Duellman, 1980
<i>Pristimantis floridus</i>	17,4 mm	18,3 mm	23,3 mm	26, 7 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis gladiator</i>	14,9 mm	15,9 mm	15,8 mm		Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis hectus</i>	13,6 mm	16,8 mm	19,4 mm	22,5 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis leoni</i>	14,8 mm	18,3 mm	19,7 mm	25 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis lucidosignatus</i>	17,1 mm		21,1 mm		Rodder & Schmitz, 2009
<i>Pristimantis munozii</i>	14,9 mm	19, 7 mm	-		Rojas-Runjaic <i>et al.</i> , 2014
<i>Pristimantis myersi</i>	13,7 mm	17,5 mm	17,5 mm	23,2 mm	Lynch, 1981
<i>Pristimantis ocreatus</i>	12,4 mm	17,2 mm	19,6 mm	20,2 mm	Lynch, 1981
<i>Pristimantis onorei</i>	17,1 mm	20,1 mm	20,1 mm	20,5 mm	Rodder & Schmitz, 2009
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	16,2 mm	18,9 mm	19,8 mm	24 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis repens</i>	13,1 mm	17,1 mm	17,5 mm	24,1 mm	Lynch, 1984
<i>Pristimantis scopaeus</i>	15,3 mm	16,7 mm	-		Lynch <i>et al.</i> , 1996
<i>Pristimantis sirnigeli</i>	18,6 mm	20,6 mm	21,1 mm	24,1 mm	Yáñez-Muñoz <i>et al.</i> , 2010
<i>Pristimantis thymelensis</i>	21,4 mm	25,2 mm	28 mm	33,5 mm	Lynch, 1981
<i>Pristimantis xeniolum</i>	-	-	-	-	

**Anexo 2.** Tamaños mínimos y máximos (LRC) de las especies del grupo *Pristimantis unistrigatus*.

<b>Especies grupo <i>Pristimantis unistrigatus</i></b>					
<b>Taxón</b>	<b>SVL ♂</b>		<b>SVL ♀</b>		<b>Referencia Bibliográfica</b>
	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	
<i>Pristimantis aaptus</i>	22,9 mm		29,9 mm	34,8 mm	Lynch & Lescure, 1980
<i>Pristimantis acerus</i>	25 mm	34 mm	45,1 mm		Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis actinolaimus</i>	22,4 mm	27,5 mm	32 mm	36,2 mm	Lynch & Rueda, 1998
<i>Pristimantis acuminatus</i>	17,1 mm	22,6 mm	25,6 mm	32,3 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis affinis</i>	-				
<i>Pristimantis alalocophus</i>	18,2 mm	23,8 mm	25,7 mm	32,1 mm	Rao-Trujillo & Ruiz-Carranza, 1991
<i>Pristimantis alberico</i>	20,6 mm	20,7 mm	25 mm	29,3 mm	Lynch & Ruiz-Carranza, 1996
<i>Pristimantis altamazonicus</i>	14,4 mm	23,1 mm	23,6 mm	33,9 mm	Lynch, 1980
<i>Pristimantis amydrotus</i>	25,8 mm	28 mm	-		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis anemerus</i>	20,4 mm	21 mm	25,5 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis angustilineatus</i>	15,8 mm	20,4 mm	20,8 mm	24,8 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis angustilineata</i>	-				
<i>Pristimantis anolirex</i>	24 mm	31,8 mm	35,5 mm	40 mm	Lynch, 1983
<i>Pristimantis anotis</i>	-		40 mm		Walker & Test, 1955
<i>Pristimantis aquilonaris</i>	13,7 mm	17,6 mm	19,4 mm	23 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis aracamuni</i>	18,2 mm		-		Barrio-Amoros & Molina, 2006
<i>Pristimantis ardalonychus</i>	19,7 mm	21,9 mm	27,4 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis atratus</i>	17,4 mm	24 mm	24,9 mm	29,2 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis aurantiguttatus</i>	17,1 mm	20,3 mm	23,1 mm	30,4 mm	Ruiz-Carranza <i>et al.</i> , 1997
<i>Pristimantis avius</i>	20 mm	24 mm	31 mm	33 mm	Myers & Donnelly, 1997
<i>Pristimantis bacchus</i>	21,2 mm	24,7 mm	23,6 mm	30,3 mm	Lynch, 1984
<i>Pristimantis baiotis</i>	18,1 mm	18,5 mm	21,5 mm		Lynch, 1998
<i>Pristimantis balionotus</i>	22,8 mm	22,2 mm	27,1 mm	29,1 mm	Lynch, 1979
<i>Pristimantis baryecus</i>	27,2 mm	30,4 mm	38,2 mm	43,5 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis batrachites</i>	18,6 mm	23,2 mm	24 mm	27,2 mm	Lynch, 2003
<i>Pristimantis bearssei</i>	22,7 mm	25,5 mm	38 mm	38,8 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis bellator</i>	16,8 mm	21,2 mm	17,2 mm	24,3 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis bernali</i>	21,3 mm	31,2 mm	-		Lynch, 1986
<i>Pristimantis bogotensis</i>	16,4 mm	19,6 mm	22 mm	27,4 mm	Peters, 1863
<i>Pristimantis cabrerai</i>	14,2 mm	17,1 mm	18,8 mm	23,4 mm	Cochran & Goin, 1970

<i>Pristimantis caeruleonotus</i>	11,6 mm	14,6 mm	20,5 mm	22,6 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis cajamarcensis</i>	18,8 mm	24,1 mm	27,1 mm	33,8 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis calcaratus</i>	15,8 mm	22,8 mm	30,7 mm	31,6 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1997
<i>Pristimantis calcarulatus</i>	17,8 mm	26,6 mm	25,3 mm	28,9 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis cantitans</i>	25 mm	35 mm	32 mm	45 mm	Mayers & Donnelly, 1996
<i>Pristimantis capitonis</i>	17,8 mm	22,7 mm	25,3 mm	28,9 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis carvalhoi</i>	13,5 mm	14,8 mm	17,4 mm	24 mm	Lynch, 1980
<i>Pristimantis cavernibardus</i>	27 mm	31 mm	30 mm	32 mm	Myers & Donnelly, 1997
<i>Pristimantis celator</i>	19,6 mm	21,4 mm	22 mm	24 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis ceuthospilus</i>	19 mm	25,8 mm	23,5 mm	26,7 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis chloronotus</i>	22,9 mm	30,3 mm	31,9 mm	38,9 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis colodactylus</i>	14 mm	20,7 mm	16,5 mm	25,8 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis colonensis</i>	15,1 mm	19,5 mm	25,6 mm	30,1 mm	Mueses-Cisneros, 2007
<i>Pristimantis colostichos</i>	21 mm		28 mm		La Marca & Smith, 1982
<i>Pristimantis corniger</i>	22,1 mm	28,1 mm	29,4 mm	38,1 mm	Lynch & Suárez-Mayorga, 2003
<i>Pristimantis coronatus</i>	-		15,3 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis cosnipatae</i>	20,4 mm	32,5 mm	24,3 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis cristinae</i>	37,8 mm	42,7 mm	58,2 mm	62,7 mm	Lynch & Ruiz-Carranza, 1985
<i>Pristimantis croceinguinus</i>	12,8 mm	18,2 mm	17,4 mm	23 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis crucifer</i>	18,3 mm	20,6 mm	22,8 mm	34,5 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis cruciocularis</i>	11,4 mm	15,4 mm	18,7 mm	21,8 mm	Duellman & Lehr 2009
<i>Pristimantis cryptomelas</i>	28,2 mm	30,2 mm	38,6 mm	39,5 mm	Duellman & Lehr 2009
<i>Pristimantis cuentasi</i>	22 mm	24,9 mm	30,6 mm		Lynch, 2003
<i>Pristimantis degener</i>	22,2 mm		31 mm	31,9 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis deinops</i>	35,1 mm	36,6 mm	38,3 mm	49,6 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1997
<i>Pristimantis delius</i>	-		30,9 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis diadematus</i>	20 mm	27,4 mm	35,4 mm	44,5 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis diaphonus</i>	24,5 mm	31,5 mm	38 mm	41,5 mm	Lynch, 1986
<i>Pristimantis diogenes</i>	23,1 mm	27,8 mm	37,1 mm	46,7 mm	Lynch & Ruiz-Carranza, 1996
<i>Pristimantis dissimulatus</i>	-		27,4 mm	32,7 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis duende</i>	16 mm	20 mm	23,8 mm	29,7 mm	Lynch, 2001
<i>Pristimantis elegans</i>	20 mm	23 mm	25 mm	30 mm	Peters, 1863
<i>Pristimantis eriphus</i>	18,1 mm	25,2 mm	25,8 mm	29 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis ernesti</i>	29,4 mm		-		Flores, 1987
<i>Pristimantis erythropleura</i>	17 mm	25,4 mm	20,8 mm	34,8 mm	Lynch, 1992

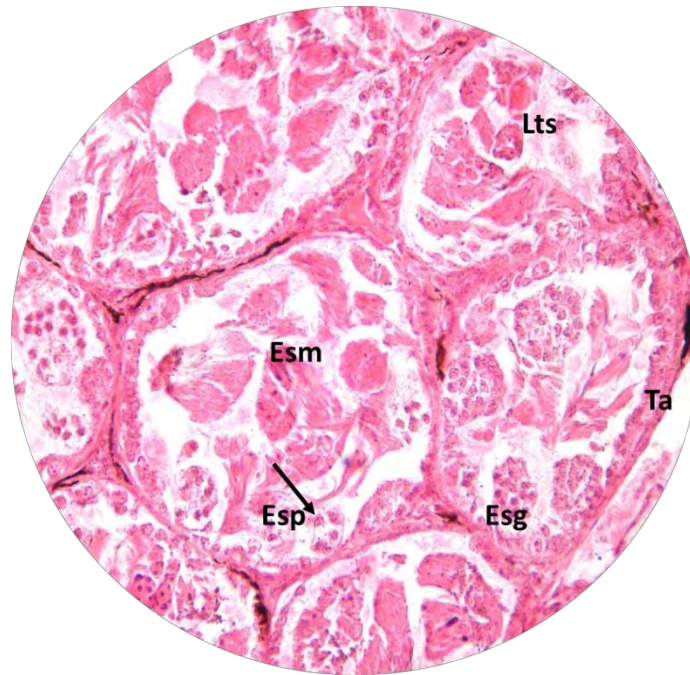
<i>Pristimantis esmeraldas</i>	15,1 mm	17,3 mm	20,6 mm	22,2 mm	Guayasamin, 2004
<i>Pristimantis eugeniae</i>	26 mm		30,5 mm	37,6 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis euphronides</i>	17,7 mm	27 mm	19,4 mm	39,4 mm	Kaiser <i>et al.</i> , 1994
<i>Pristimantis eurydactylus</i>	18,2 mm	23,6 mm	33,5 mm	35,3 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis exoristus</i>	15 mm	16,9 mm	21,3 mm	23,5 mm	Duellman & Pramuk, 1999
<i>Pristimantis flavobracatus</i>	18,2 mm	19,6 mm	21,5 mm	23,4 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis glandulosus</i>	24,2 mm	30,2 mm	31,8 mm	41,3 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis gracilis</i>	24,9 mm	30,5 mm	36,7 mm	43,9 mm	Lynch, 1986
<i>Pristimantis grandiceps</i>	-				
<i>Pristimantis helvolus</i>	18,8 mm	19,9 mm	25,6 mm		Lynch & Rueda-Almonacid, 1998
<i>Pristimantis hernandezi</i>	21,8 mm	27,7 mm	35,2 mm		Lynch & Ruiz-Carranza, 1983
<i>Pristimantis ignicolor</i>	18 mm		26,4 mm		Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis imitatrix</i>	13 mm	14 mm	14,6 mm	20,2 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis incanus</i>	14,9 mm	19,4 mm	23,9 mm	30,6 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis infraguttatus</i>	15,8 mm		22,9 mm	24,3 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis inguinalis</i>	17,7 mm		20,3 mm		Parker, 1940
<i>Pristimantis inusitatus</i>	15 mm	22,6 mm	17,3 mm	25,6 mm	Ron <i>et al.</i> , 2017
<i>Pristimantis jester</i>	19,4–22,8 mm				Bruce-Means & Savage, 2007
<i>Pristimantis juanchoi</i>	18,1 mm	23 mm	24,2 mm	28,3 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1997
<i>Pristimantis jubatus</i>	37,8 mm	39,4 mm	39,6 mm	42 mm	Garcia & Lynch, 2006
<i>Pristimantis karelinae</i>	-				
<i>Pristimantis kaptoptroides</i>	-				
<i>Pristimantis kelephus</i>	15,8 mm	21,3 mm	27 mm	31,5 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis lemur</i>	19,3 mm	22,7 mm	24,7 mm	27,8 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1998
<i>Pristimantis leucopus</i>	30 mm	37,8 mm	42,3 mm	44 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis lichenoides</i>	26 mm	31,6 mm	33,5 mm	41,8 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1997
<i>Pristimantis lindae</i>	-		29,6 mm	39,2 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis lirellus</i>	14,1 mm	17 mm	19,4 mm	24,5 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis lividus</i>	18,2 mm	20,4 mm	32,9 mm	35 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis llojsintuta</i>	20,3 mm	21,4 mm	-		Köhler & Lötters, 1999
<i>Pristimantis luscombei</i>	19,1 mm	19,9 mm	26,1 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis luteolateralis</i>	16,6 mm	23,6 mm	25,6 mm	29,5 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis lutitus</i>	17-24 mm				Lynch, 1984
<i>Pristimantis lynchi</i>	17 mm	22 mm	24 mm	29 mm	Duellman & Simmons, 1977
<i>Pristimantis lythrodes</i>	16,4 mm	18,2 mm	23,6 mm	25,8 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis marahuaka</i>	22,5 mm	29,2 mm	25 mm	27 mm	Fuentes & Barrios-Amorós, 2004
<i>Pristimantis marmoratus</i>	18,1 mm	19,9 mm	21 mm	24,2 mm	Lescure, 1981
<i>Pristimantis memorans</i>	19 mm	23 mm	31 mm	32 mm	Myers & Donnelly, 1997
<i>Pristimantis merostictus</i>	22 mm				Lynch, 1984

<i>Pristimantis minutulus</i>	13,1 mm	17,6 mm	17 mm	20,1 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis mnionaetes</i>	17,9 mm	20,8 mm	30,2 mm	33,5 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis modipeplus</i>	24,6 mm	28,5 mm	28 mm	34,7	Lynch, 1981
<i>Pristimantis molybrignus</i>	21,3 mm	29,3 mm	34 mm	42,1 mm	Lynch, 1986
<i>Pristimantis mondolfi</i>	-				
<i>Pristimantis muricatus</i>	31,8 mm	40,7 mm	33,8 mm	36 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis muscosus</i>	-		29,6 mm	46,1 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis myops</i>	10,9 mm	13,6 mm	14,6 mm	17,2 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis nephophilus</i>	22,6 mm		24,6 mm	34 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis nervicus</i>	18,5 mm		26 mm		Lynch, 1994
<i>Pristimantis nicefori</i>	21,5 mm				Cochran & Goin, 1970
<i>Pristimantis nigrogriseus</i>	19,3 mm	26 mm	28,5 mm	30,2 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis nyctophylax</i>	21,9 mm	31,4 mm	32,1 mm	37,8 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis ornatissimus</i>	21,6 mm	27 mm	37,8 mm	38,1 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis orphnolaimus</i>	-		24,8 mm		Lynch, 1980
<i>Pristimantis palmeri</i>	15,2 mm	20,3 mm	23 mm	28,4 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1997
<i>Pristimantis parvillus</i>	15,5 mm	19,6 mm	18,4 mm	25,9 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis pastazensis</i>	19,5 mm		30,9 mm	31,7 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis paululus</i>	13,6 mm	17,1 mm	16,5 mm	19,4 mm	Lynch, 1974
<i>Pristimantis penelopus</i>	-				
<i>Pristimantis percnopterus</i>	21,5 mm	23,2 mm	25,9 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis percultus</i>	-				
<i>Pristimantis permixtus</i>	21,9 mm	31,4 mm	32,4 mm	45,4 mm	Lynch <i>et al.</i> , 1994
<i>Pristimantis petrobardus</i>	27 mm	39,5 mm	38 mm	43 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis phalarus</i>	15,3 mm	17,6 mm	17,5 mm	22,3 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis philippi</i>	17 mm	19 mm	21 mm		Lynch & Schwartz, 1971
<i>Pristimantis phoxocephalus</i>	22,3 mm	29,9 mm	29,6 mm	38,4 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis phragmipleurom</i>	-				
<i>Pristimantis platyichilus</i>	25,3 mm	29,7 mm	42 mm	50,9 mm	Lynch & Rueda-Almonacid, 1997
<i>Pristimantis platydactylus</i>	20,1 mm	23,8 mm	23,8 mm	35,3 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis prolatus</i>	13,7 mm	18,4 mm	20,8 mm	24,1 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis proserpens</i>	15,2 mm	21 mm	20,2 mm	23,5 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis pseudoacuminatus</i>	12,7 mm	17,6 mm	18,1 mm	22,4 mm	Lynch, 1980
<i>Pristimantis pteridophilus</i>	17,6 mm	25,1 mm	31,9 mm	33,9 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis pugnax</i>	2,1 mm	28 mm	30,8 mm	33,2 mm	Lynch & Duellman, 1980

<i>Pristimantis pycnodermis</i>	18 mm	32,3 mm	32,5 mm	44,4 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis quaiquinimensis</i>	-				
<i>Pristimantis quantus</i>	11,6 mm	14,5 mm	14,4 mm	16,7 mm	Lynch, 1998
<i>Pristimantis reclusus</i>	25,2 mm	32,4 mm	-		Lynch, 2003
<i>Pristimantis renjiformis</i>	21,9 mm	23,8 mm	25 mm	31,3 mm	Lynch, 2000
<i>Pristimantis rhabdocnemus</i>	16,7 mm	21,2 mm	23,2 mm	27 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis rhodoplichus</i>	21,8 mm	28,9 mm	30,1 mm	34,2 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis rhodostichus</i>	19,3 mm		19,7 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis riveroi</i>	15,5 mm	23,3 mm	29,8 mm	35,8 mm	Lynch & La Marca, 1993
<i>Pristimantis riveti</i>	-				
<i>Pristimantis roseus</i>	13,2 mm	20,2 mm	25,7 mm	27,9 mm	Lynch, 1999
<i>Pristimantis rozei</i>	-		20,3 mm		Lynch & La Marca, 1993
<i>Pristimantis rufioculis</i>	18,1 mm	18,9 mm	20,6 mm	25,4 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis ruidus</i>					
<i>Pristimantis salaputium</i>	13,9 mm	18,6 mm	21,1 mm	23 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis saltissimus</i>	-				
<i>Pristimantis scitulus</i>	-		22,5 mm	24,6 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis serendipitus</i>	20,4 mm	21,2 mm	-		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis shrevei</i>	21 mm	28 mm	19 mm	40,1 mm	Kaiser <i>et al.</i> , 1994
<i>Pristimantis signifer</i>	22,6 mm	26,5 mm	29,2 mm	32,8 mm	Ruíz-Carranza <i>et al.</i> , 1997
<i>Pristimantis spilogaster</i>	17 mm	23 mm	27 mm		Lynch, 1984
<i>Pristimantis spinosus</i>	16,1 mm	25 mm	28,3 mm	34,5 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis sternothylax</i>	18,3 mm	29,1 mm	28,3 mm	36,7 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis subsigillatus</i>	19,3 mm	28,5 mm	30 mm	33,4 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis supernatis</i>	18,6 mm	30 mm	31,1 mm	40,6 mm	Lynch, 1979
<i>Pristimantis taciturnus</i>	17,6 mm	20,9 mm	24,2 mm	31,7 mm	Lynch & Suárez-Mayorga, 2003
<i>Pristimantis tamsitti</i>	32,7 mm	37,8 mm	47,5 mm	54,7 mm	Lynch <i>et al.</i> , 1994
<i>Pristimantis tantanti</i>	19,6 mm	21,9 mm	-		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis telefericus</i>	-				
<i>Pristimantis tepuiensis</i>	34,7 mm				Schlüter & Rödder, 2006
<i>Pristimantis thymalopsiodes</i>	28 mm	34,4 mm	46,9 mm	55,4 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis torrenticola</i>	26,2 mm	32,1 mm	39,7 mm	52,6 mm	Lynch & Rueda, 1998
<i>Pristimantis trachyblepharis</i>	12,1 mm	15,8 mm	15,8 mm	19,2 mm	Lynch & Duellman, 1980
<i>Pristimantis tubernasus</i>	-				
<i>Pristimantis turpinorum</i>	-				
<i>Pristimantis</i>	-				

<i>turumiquirensis</i>					
<i>Pristimantis uisae</i>	-		26,3 mm	31,2 mm	Lynch, 2003
<i>Pristimantis unistrigatus</i>	14,9 mm	28,8 mm	22,5 mm	38,5 mm	Lynch & Rueda, 1998
<i>Pristimantis urichi</i>	17,5 mm	22,6 mm	23,1 mm	25 mm	Kaiser <i>et al.</i> , 1994
<i>Pristimantis vanadise</i>	16,9 mm	19,1 mm	26,6 mm	31,7 mm	La Marca, 1984
<i>Pristimantis variabilis</i>	13,7 mm	22 mm	10 mm	26,8 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis ventrimarmoratus</i>	17,8 mm	25,5 mm	33,3 mm	43,8 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis verecundus</i>	18 mm	21,9 mm	20,7 mm	22,5 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis vermiculatus</i>	19,7 mm		20,8 mm	35,3 mm	Duellman & Lehr, 2007
<i>Pristimantis versicolor</i>	19,3 mm	25,2 mm	22,7 mm	29,8 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis vicarius</i>	20 mm	30,3 mm	28,5 mm	34,2 mm	Lynch & Ruiz-Carranza, 1983
<i>Pristimantis vilcabambae</i>	13,5 mm	14,6 mm	21,1 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis wagneri</i>	30 mm		43 mm	44 mm	Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis walkeri</i>	13,8 mm	18,5 mm	19,4 mm	25,3 mm	Lynch & Duellman, 1997
<i>Pristimantis wiensi</i>	27,3 mm	33 mm	37 mm		Duellman & Lehr, 2009
<i>Pristimantis yaviensis</i>	18 mm	21 mm	24 mm	30 mm	Myers & Donnelly, 1997
<i>Pristimantis yustizi</i>	35 mm		50.8 mm		Barrio-Amorós & Chacón-Ortiz, 2004
<i>Pristimantis zoilae</i>	-				

**Anexo 3.** Fotomicrografía obtenida de cortes de testículos de machos de *Pristimantis unistrigatus*. Macho adulto en actividad reproductiva.



**Ta-** túnica albugínea, **Epg-** Espermatogonia, **Esp-** espermatoцитos, **Esm-** espermátidas, **Lts-** luz del túbulo seminífero. Fotomicrografía tomada y modificada de Cepeda-Quilindo (2014).