



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

**“Efecto de la desecación sobre el desarrollo larval y metamorfosis de
Mannophryne cordilleriana (Anura: Aromobatidae)”**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la bachiller
Michelle C. Castellanos Montero como
requisito parcial para optar al
Título de Licenciada en Biología

Tutores: Dr. Enrique La Marca

Dr. Luis Gonzalo Morales

CARACAS, VENEZUELA

MARZO-2018

DEL EXÁMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA
BACHILLER MICHELLE C. CASTELLANOS M.

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), para examinar el Trabajo Especial de Grado (T.E.G.) presentado por la **Br. Michelle Carolina Castellanos Montero**, C.I. **21.424.496**, titulado **“Efecto de la desecación sobre el desarrollo larval y metamorfosis de *Mannophryne cordilleriana* (Anura: Aromobatidae)”**, para optar al título de Licenciada en Biología; consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela y, por lo tanto, lo declaramos **aprobado** con una calificación de **diecinueve (19)** puntos y solicitud de **Mención Honorífica**.

Caracas, a los 16 días del mes de marzo de 2018.



J. Celsa Señaris
C.I. V-9.119.392
Jurado Principal



Hedelvy Guada
C.I. V-5.567.401
Jurado Principal



Enrique La Marca
C.I. V.-4.241
Tutor



Luis Gonzalo Morales
C.I.V.- 7.240.222
Asesor Académico

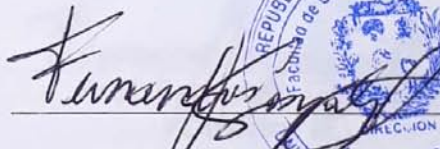


Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que a través de una consulta de fecha 28/05/2018, los miembros del Consejo de la Escuela de Biología acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller. **Catellanos M., Michelle C.**, titular de la cédula de identidad No. 21.424.496; titulado: **"Efecto de la desecación sobre el desarrollo larval y metamorfosis de Mannophryne cordilleriana (Anura: Aromobatidae)."**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los ocho días del mes de junio del año dos mil dieciocho.


Prof. Fernando González
Director (E)



FG/mb.-

Índice general

Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
Objetivos.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
Materiales y métodos.....	10
Área de estudio.....	10
Captura de ejemplares.....	13
Cría en cautiverio.....	14
Diseño Experimental.....	16
Toma de datos.....	20
Análisis de datos.....	23
Resultados.....	27
Crecimiento.....	28
Tiempo de desarrollo.....	31
Supervivencia.....	34
Discusión.....	36
Conclusiones.....	41
Recomendaciones.....	42
Bibliografía.....	43
Apéndice.....	46

A Venezuela:

Que la investigación crezca en ti
y que desde cualquier ámbito,
todo granito por salvarte valga la pena.
Que crezcamos juntas.

Agradecimientos

Quiero agradecer inmensamente a mi familia, por impulsarme en mi carrera aun antes de yo entender que se llamaba biología, por entender que me gustaban más las ranas que las pinturas de uñas y que prefería estar llena de barro que de escarcha. Gracias a mis hermanitos por su divertida curiosidad por las ranas, a mi mamá por ponerme botas de caucho con vestidos y a mi papá por enseñarme el amplio uso de la palabra “anfibio”. Gracias por entender mis salidas de campo y mis “no puedo porque estoy estudiando”.

Gracias a Fernando J.M. Rojas-Runjaic por ser mi mayor maestro desde el inicio de mi carrera, por enseñarme tanto, por convertirme en maniática del orden a la hora de trabajar, por impulsarme a estudiar renacuajos, por el apoyo y la asesoría durante el transcurso de este trabajo y por siempre estar allí cada vez que tengo una duda.

Gracias a Enrique La Marca por enamorarse junto a mí de esta idea, por su pasión por la conservación de anfibios y su gran aporte en la logística y ejecución de este trabajo a través de su experiencia. Gracias a Enzo La Marca por su apoyo antes y durante este trabajo, por sus palabras alentadoras cada vez que sentía que algo podía salir mal y por su entendimiento ante el estrés y las horas sin dormir. Sin ustedes dos esto no hubiese sido posible, este trabajo también es de ustedes.

Gracias al profesor Luis Gonzalo Morales por su interés en este tema desde el primer día que se lo comenté y por su extraordinario apoyo, asesoría y enseñanza.

Gracias a todos los que me acompañaron y apoyaron en mis viajes casi interminables entre Mérida-Caracas y a toda persona y/o circunstancia que sin saberlo me guió hasta acá. Gracias.

Resumen

Mannophryne cordilleriana es una especie de anfibio endémica de la Sierra de Santo Domingo (Mérida, Venezuela). Está incluida en la categoría de Peligro Crítico de Extinción de la Lista Roja de la IUCN y en la categoría de Datos Insuficientes de la Lista Roja de Venezuela. Debido a condiciones naturales posiblemente exacerbadas por actividades humanas, las quebradas que suele habitar se secan o se reducen drásticamente durante la temporada seca. Experimentos con especies de pozas temporales muestran que renacuajos de algunas familias responden ante la desecación acortando el período de desarrollo a expensas de una reducción en su tamaño corporal. Sin embargo, este tipo de experimentos no se han realizado con especies de la familia Aromobatidae. Por lo tanto, se estudió el efecto de la disminución experimental del volumen de agua sobre la supervivencia, el crecimiento y el tiempo de desarrollo de renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* criados en la Ciudad de Mérida. Se aplicaron dos tratamientos, uno control con un volumen de agua alto y constante y otro experimental con un régimen de reducción del volumen de agua que simuló la desecación natural debida a la evaporación del agua de las pozas durante el período seco. Se obtuvo que los renacuajos bajo el tratamiento de disminución del volumen de agua culminaron el desarrollo larval y la metamorfosis aproximadamente 10 semanas después que los del tratamiento control (luego de haber restablecido un volumen de agua alto ya que ninguno de los renacuajos alcanzó la metamorfosis bajo condiciones de desecación). Los postmetamorfos del tratamiento de disminución resultaron ser, en promedio, 13% más pequeños. Al reducir al mínimo el volumen de agua, la supervivencia disminuyó drásticamente. Se concluyó que los renacuajos de *M. cordilleriana* no son capaces de acelerar su desarrollo durante la desecación, al contrario, se desarrollan más lento, aumentando su probabilidad de morir en épocas secas. Además, si logran sobrevivir, culminan la metamorfosis con tallas menores, disminuyendo su probabilidad de éxito en las etapas subsiguientes.

Palabras clave: anfibios, *Mannophryne*, desecación, desarrollo larval, metamorfosis, renacuajos, cría *ex situ*.

Introducción

Debido a su clima y a su diverso mosaico paisajístico, Venezuela alberga un patrimonio biológico valioso y diverso que incluye 5% de la riqueza total de anfibios del planeta (Señaris y col., 2014). Sin embargo, en todo el planeta los anfibios están desapareciendo a tasas mil veces más altas que la tasa natural (IUCN 2004 en Molina y col. 2009) y la anurofauna venezolana no es la excepción, en especial las especies andinas. En particular, algunas especies andinas de la familia Aromobatidae ya han sufrido graves reducciones poblacionales y extinciones locales (IUCN, 2017; La Marca, 2005).

Las actividades agrícolas y ganaderas, el desarrollo residencial, la contaminación y posiblemente el cambio climático son las principales amenazas de los anfibios (IUCN, 2017). No obstante, las disminuciones más drásticas y las extinciones más recientes están asociadas a la presencia del patógeno fúngico *Batrachochytrium dendrobatidis*, causante de la quitridiomycosis cutánea (Berger y col., 1998 en Molina y col. 2009).

Los registros de presencia de este hongo en poblaciones de anfibios neotropicales indican que los hábitats ubicados sobre 1.000 m.s.n.m. son los más adecuados para su crecimiento y los períodos de sequías severas y de aumento sostenido de la temperatura funcionan como agentes que aumentan la susceptibilidad de los anfibios ante el patógeno (Molina y col. 2009). Estos factores son altamente determinantes para la presencia de *B. dendrobatidis* en la Cordillera de Mérida, donde hasta los momentos 17 especies de anuros presentan infección por el patógeno, el cual ha sido vinculado con la extinción de especies del género *Atelopus* (Sánchez y col. 2008 en Molina y col. 2009).

En cuanto al declive de las poblaciones de ranas aromobátidas andinas, también destacan las condiciones de sequía de algunos años, motivadas posiblemente por cambios climáticos y por la deforestación de bosques nublados (La Marca, 2005).

Mannophryne cordilleriana (La Marca, 1994) es una especie endémica de la Cordillera de Mérida, específicamente de la Sierra de Santo Domingo. Al igual que la mayoría de los aromobátidos, es una especie diurna, habita en pequeñas quebradas de pendientes pronunciadas y presenta cuidado parental, en el cual los huevos son depositados entre la hojarasca donde son protegidos por el macho, y una vez que eclosionan, los transporta sobre su dorso hacia pozos o remansos de la quebrada donde completan su desarrollo. En 2008 fue incluida en la categoría de Peligro Crítico de Extinción de la Lista Roja de la IUCN debido a que se encuentra restringida a un área de 2km², su distribución está severamente fragmentada, la extensión y calidad de su hábitat continúa declinando, posee riesgo potencial de contraer quitridiomicosis y se han reportado ejemplares con malformaciones probablemente atribuidas a la contaminación (Sánchez, 2010). Sin embargo, en la Lista Roja Venezolana está incluida en la categoría de Datos Insuficientes (www.wikieva.org.ve).

La región donde habita *M. cordilleriana* tiene un patrón climático biestacional con un período anual de reducción de la precipitación entre noviembre y marzo, el cual se intensifica durante los dos o tres primeros meses del año, reportándose precipitaciones medias de 15,6 mm y déficit hídrico (Aranguren y col., 2012) (figura 1). A pesar de tratarse de un patrón natural, el desarrollo de actividades humanas y posiblemente el cambio climático acentúan dicho período seco y en tales condiciones, las quebradas donde normalmente habitan los renacuajos de *M. cordilleriana* desaparecen o se reducen a pequeñas pozas parcialmente aisladas entre sí. Estos sitios actúan como ambientes lénticos en lugar de ambientes lóticos y en casos extremos se secan

por completo. Esto ha causado la concentración de un gran número de renacuajos en pequeñas pozas durante dichos meses (La Marca, E.; Rojas-Runjaic, F.J.M, com. pers.), evidenciándose así que aunque *M. cordilleriana* se reproduce en temporada de lluvias, existen renacuajos en proceso de desarrollo durante la estación seca.

En la mayoría de las especies de anfibios, el tiempo y tamaño hasta alcanzar la metamorfosis es altamente variable y depende de factores como la disminución del volumen de agua (Michimae y Emura, 2012), la densidad larval (Goater, 1994; Newman, 1998), la presencia de depredadores (Orizaola y col., 2013), la temperatura (Gómez-Mestre y Buchholz, 2006; Walsh y col., 2008), la disponibilidad de alimento (Morey y Reznick, 2000; Rudolf y Rödel, 2007) y las complejas interacciones entre estos factores (Grözinger y col., 2014, tomado de Székely, 2010). Por ello, el hidroperiodo constituye una fuerte presión selectiva sobre los anfibios, ante la cual usualmente expresan un alto grado de plasticidad en la duración del periodo larval (Székely, 2017). Sin embargo, los efectos ante la desecación han sido investigados en pocas especies de anuros que se reproducen en pozas temporales y no existen estudios previos en ranas aromobátidas, las cuales son propias de ambientes lóticos que en ciertos momentos pueden comportarse como ambientes lénticos.

La plasticidad fenotípica, definida como la producción de múltiples fenotipos a partir de un solo genotipo según de las condiciones ambientales (Bradshaw, 1965; Miner y col. 2005; Sultan y Stearns, 2005), se considera particularmente adaptativa en anfibios de hábitats impredecibles donde los individuos mueren si no completan la metamorfosis antes de que la poza se seque (Newman, 1992; Padilla y Adolph, 1996 en Székely, 2017). Como respuesta a la acción del ambiente, los renacuajos culminan rápidamente el desarrollo y la metamorfosis pero a expensas de un menor tamaño corporal. Estos individuos pueden abandonar la poza antes de que esta se

seque por completo pero su menor tamaño corporal puede implicar una supervivencia reducida durante la etapa juvenil, lo cual puede afectar la edad de la primera reproducción (Martof 1956, Turner 1962, Clarke 1974, Berven 1982, Pough y Kamel 1984, Taigen y Pough 1985, Werner 1986, Smith 1987, Semlitsch y col. 1988, John-Alder y Morin 1990, Goater y col. 1993, Newman y Dunham 1994 en Denver 1998).

Aunque puede haber especies de anuros que habiten zonas con un patrón climático muy similar, que se enfrenten a las mismas amenazas humanas y que no se encuentren en peligro crítico de extinción, es la autoecología de cada especie el factor principal que determina la vulnerabilidad de la misma ante dichas amenazas (Molina y col. 2009). Por ello, es sumamente importante conocer el efecto de la desecación del hábitat sobre los renacuajos de *Mannophryne cordilleriana*, ya que si son capaces de responder ante dicho estímulo ambiental y los tamaños de los juveniles les permiten sobrevivir, las poblaciones tendrán una mayor probabilidad de mantenerse. De no ser así, la desecación podría afectar drásticamente una parte vital de su ciclo de vida (renacuajos y metamorfos), ejerciendo un fuerte impacto en la tasa de reposición de adultos, y consecuentemente en toda la dinámica poblacional.

Aun cuando los aromobátidos constituyen uno de los mejores exponentes de la anurofauna andina por su riqueza y endemismo, hay poca información sobre su fisiología y ecología debido a su compleja taxonomía y a su coloración críptica poco llamativa (La Marca, 2005). Como se mencionó anteriormente, en Venezuela se han reportado disminuciones poblacionales drásticas y extinciones locales de varias especies endémicas andinas de la familia Aromobatidae. Desafortunadamente, por estar en peligro de extinción, algunos estudios sobre la ecología de dichas especies pueden implicar algún riesgo, y esto dificulta conocer cuáles son los factores que las han conducido hasta dicho estado. Por lo tanto, conocer la respuesta de los

renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* ante la desecación puede ser útil para relacionar el estado de poblaciones silvestres amenazadas con respecto a la fuerte estacionalidad climática de la región. Adicionalmente, conocer esa respuesta puede aportar información importante para inferir el efecto de la desecación sobre *Aromobates meridensis* (Grant y col., 2006) y *A. zippeli* (Barrio-Amorós y Santos, 2012), cuyos hábitats también atraviesan períodos con bajos niveles de precipitación y cuyas poblaciones se encuentran en muy malas condiciones (Castellanos, M. obs. pers. y La Marca, E. com. pers). En el caso de *A. meridensis* se ha documentado que los períodos secos han sido más marcados y prolongados por la destrucción de bosques nublados del Sur del Lago de Maracaibo (La Marca, E. com. pers) y por la deforestación total de los márgenes de la quebrada donde habita la población actualmente conocida (Castellanos, M. obs. pers). En el caso de *A. zippeli* se ha documentado una gran reducción poblacional asociada a la destrucción de hábitat y a la disminución del volumen de agua de la quebrada que suele habitar. Este proceso está agravado por la redirección del agua mediante tuberías para su uso en actividades humanas (Castellanos, M. obs. pers., La Marca, E. com. pers).

Antecedentes

La descripción de historia natural y morfología de los renacuajos comenzó a partir de los primeros naturalistas, reforzando la clasificación de los anuros. En ese entonces, se consideraba que estas características eran menos importantes que los caracteres osteológicos de los adultos (Vial, 1973). En 1940 se construyó la primera tabla de estadios de *Rana pipiens* (Shumway, 1940), la cual facilitó el estudio del desarrollo embrionario y larval de otras especies. Sucesivamente se fueron realizando otras clasificaciones como las de Taylor y Kollros (1946), Ruhg (1951) Limbaugh y Volpe (1957) y Volpe (1959), hasta que en 1960, Gosner propuso una tabla generalizada que sintetizaba el desarrollo embrionario, el larval y la metamorfosis de los anuros; dicha tabla permite clasificar individuos en distintos estadios según su nivel de desarrollo y evidenciar cómo varía entre especies.

En 1973, Wilbur y Collins propusieron un modelo que describía el desarrollo larval de los anfibios, incluyendo tres aspectos relevantes: un periodo de crecimiento inicial con tendencia exponencial, una desaceleración y finalmente una pérdida de peso en el momento antes de comenzar la metamorfosis. Además, realizaron dos experimentos con salamandras y anuros en el que compararon las tasas de crecimiento y el tiempo de desarrollo bajo distintas densidades poblacionales iniciales, obteniendo diferencias significativas entre poblaciones y dentro de las poblaciones.

A partir de ese momento se comenzaron a realizar distintos experimentos en los que se compararon las tasas de crecimiento y el tiempo de desarrollo de renacuajos bajo la influencia de factores externos como volumen del agua (Wilbur, 1987), temperatura (Downie y col., 2004) competencia (Richter y col., 2009) y depredación (McCollum y Leimberger, 1997).

En cuanto al efecto de la disminución del volumen de agua sobre el desarrollo larval, se han realizado experimentos con especies de pozas temporales (tropicales y de desierto), en los que destacan el de Newman (1989) con *Scaphiopus couchii*, quien obtuvo 50% de reducción del periodo larval con respecto al del tratamiento control (Wells, 2007; Székely, 2010) y el de Morey y Reznick (2004) con *Spea hammondi*, quienes obtuvieron 62% de reducción. También se han realizado experimentos con especies de las familias Alytidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Bufonidae, Hylidae y Ranidae, donde se han obtenido respuestas desde 3% hasta 32% de reducción del periodo larval, con y sin diferencias en tallas (Székely y col., 2010). A pesar de ello, no se han realizado experimentos de este tipo con especies de la familia Aromobatidae ni con familias filogenéticamente cercanas como Dendrobatidae que pueden verse sometidas a periodos estacionales relativamente secos durante su desarrollo larval.

Recientemente, Székely (2017) estudió la respuesta plástica a la desecación en *Ceratophrys stolzmanni* (familia Ceratophryidae), una especie de Ecuador y Perú, con hábitos subterráneos, que se reproduce en pozas temporales durante épocas de lluvia (Ortiz y col. 2013 en Székely, 2017). En dicho trabajo se encontró que los individuos criados en un nivel de agua alto y constante fueron grandes y pesados, mientras que los criados bajo disminución paulatina del volumen de agua fueron más pequeños y se desarrollaron más rápido. Estos resultados coinciden con los de trabajos anteriores, evidenciando un patrón general bajo el cual se considera que responden los renacuajos ante la desecación del ambiente, en el cual aceleran su desarrollo pero a expensas de un menor tamaño y peso corporal.

Aun cuando se ha documentado que el hábitat de *Mannophryne cordilleriana*, de *Aromobates meridensis* y de *A. zippeli* ha sido drásticamente modificado propiciando condiciones ambientales más secas que pudieran incrementar su riesgo a la extinción (Castellanos, M. obs.

pers. y La Marca, E. com. pers), en Venezuela no se han realizado estudios sobre el impacto de la desecación ambiental en anuros.

Mannophryne cordilleriana no ha sido criada anteriormente en cautiverio; sin embargo, en Venezuela se han llevado a cabo proyectos exitosos de cría *ex situ* con *Mannophryne collaris* en el Centro de Conservación de Reptiles y Anfibios Andinos de Venezuela de la ciudad de Mérida (CC-RAAV) (La Marca, 2015,2016) y con *Mannophryne vulcano* en el Terrario del Parque Generalísimo Francisco de Miranda en la ciudad de Caracas (Hernández, 2015).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el efecto de la reducción del volumen de agua sobre la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* bajo condiciones de sequía simuladas en laboratorio.

Objetivos específicos

- Evaluar la supervivencia de los renacuajos.
- Describir el efecto de la reducción del volumen de agua sobre el patrón y la tasa de crecimiento de los renacuajos hasta alcanzar el estado postmetamorfo (estadio 46 de Gosner).
- Evaluar el efecto de la reducción del volumen de agua sobre la duración del desarrollo larval y de la metamorfosis.

Materiales y métodos

Área de estudio

Mannophryne cordilleriana habita unas pocas localidades de la vertiente oriental de la Cordillera de Mérida entre Santo Domingo y Barinitas con un rango altitudinal entre 1300 y 1950 m.s.n.m (Sánchez, 2010). Los renacuajos se capturaron en la localidad tipo de la especie (8°52'53,3"N - 70°38'10,8"W), en las inmediaciones de la Represa Hidroeléctrica José Antonio Páez, a 1600 m.s.n.m, cerca del sector La Mitisús (estado Mérida), en la carretera trasandina Mérida-Barinas.

Esta zona se caracteriza por presentar un patrón biestacional con una estación lluviosa de Abril a Octubre y una estación seca de Noviembre a Marzo (Figura 1), en la cual existe un déficit hídrico durante los meses Enero a Marzo, seguido por un exceso de agua durante los meses subsiguientes, lo cual permite el desarrollo de una vegetación semicaducifolia (Aranguren y col. 2012) característica de un bosque húmedo premontano.

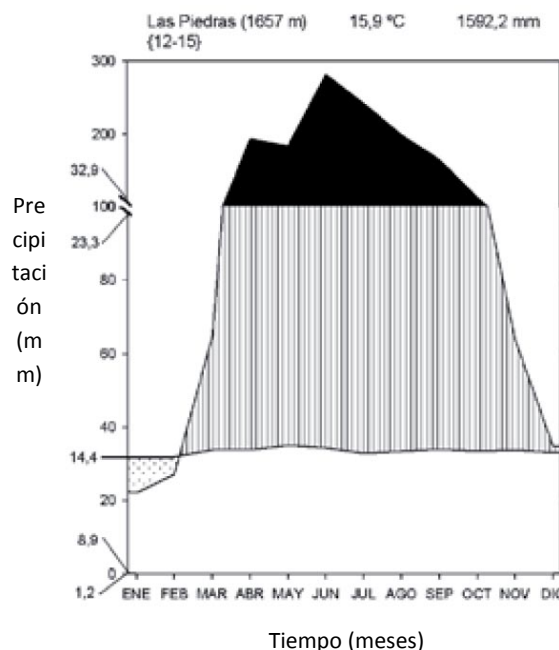


Figura 1. Climadiagrama de Gausson de la estación climatológica Las Piedras (Aranguren y col. 2012).

Cerca de la zona de captura de los ejemplares están ubicadas dos estaciones climatológicas que permiten caracterizar el clima local: Estación La Mitisús (3115) a 8°53'15"N - 70°38'30"W y 1666 m.s.n.m. y Estación Las Piedras (3099) a 8°53'35"N - 70°38'21"W y 1694 m.s.n.m. El registro de pluviosidad en la Estación La Mitisús desde 1956 hasta 2009 permite estimar una precipitación media anual de 1626 mm y una precipitación media de 15,6 mm durante el mes más seco (Enero) (Figura 2). Por otra parte, el registro de temperatura y precipitación en la Estación Las Piedras de 1969 a 1983 evidencia temperaturas promedio máximas y mínimas entre 22 -23,3°C y 8,9 - 12,6°C respectivamente (Figura 3), una temperatura extrema superior de 32,9°C, una precipitación media anual de 1592 mm y una precipitación media de 22 mm durante el mes de Enero. Adicionalmente, La Marca (1994) estimó que la temperatura del agua de la quebrada de la localidad tipo de *M. cordilleriana* oscila entre 18,5 y 23,5°C mientras que Doreste (2014), estimó que oscila entre 16 y 22°C (Figura 4).

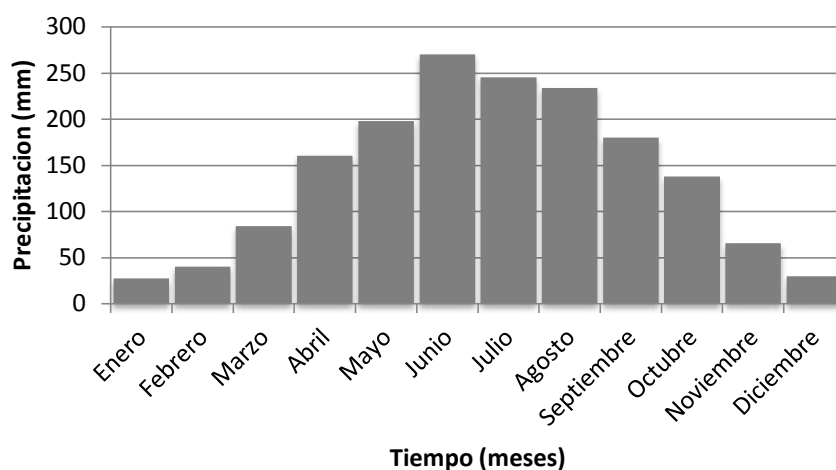


Figura 2. Precipitación promedio mensual en La Mitisús durante el período 1956 - 2009 (Doreste, 2014).

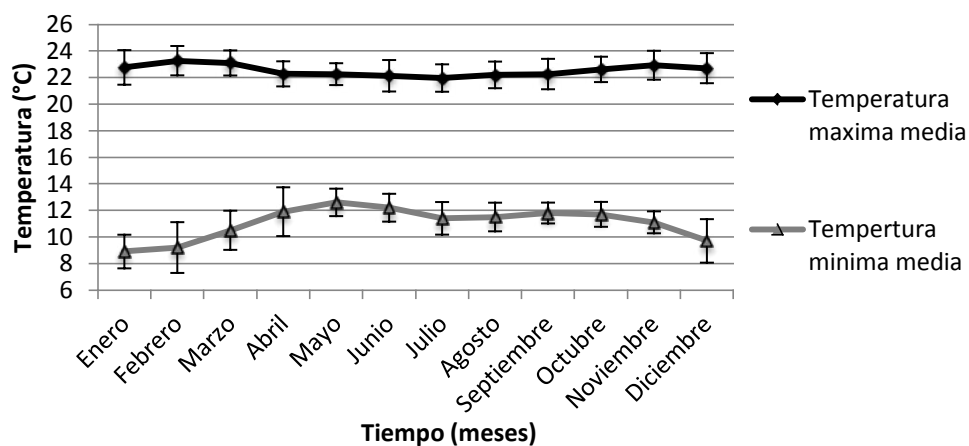


Figura 3. Temperaturas máximas y mínimas medias en Las Piedras desde 1969 hasta 1983 (Doreste, 2014).

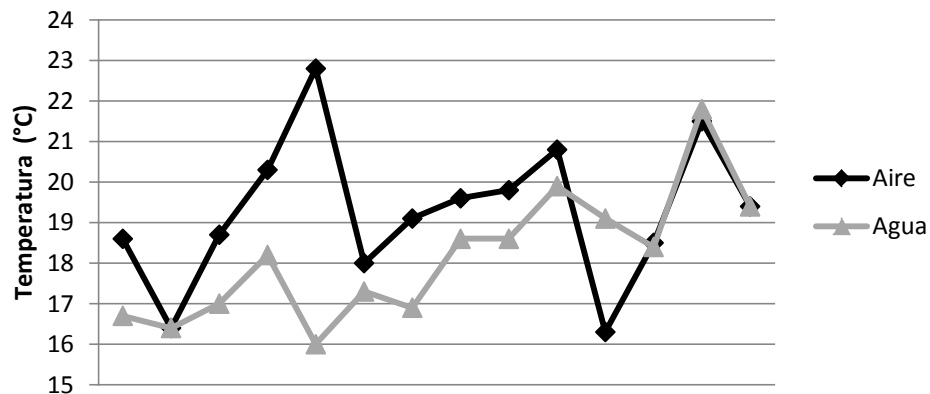


Figura 4. Temperaturas del aire y del agua en la localidad tipo de *Mannophryne cordilleriana* reportadas por Doreste (2014).

La localidad tipo de *Mannophryne cordilleriana* no se encuentra bajo algún régimen de administración especial y según La Marca (2005) es un ambiente altamente degradado con alta fragmentación de hábitat y presencia de residuos sólidos y efluentes, que posiblemente, en conjunto con la presencia de nemátodos, conllevan a las deformaciones comúnmente detectadas en la población de anuros.

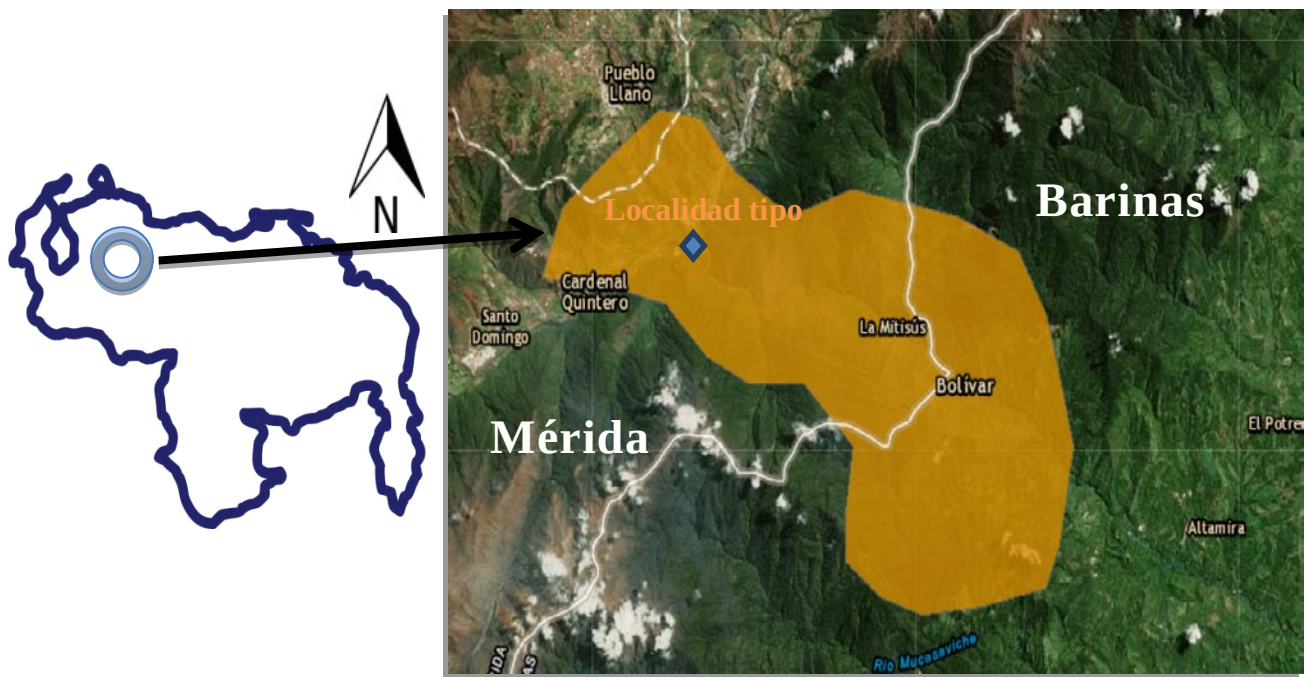


Figura 5. Distribución geográfica de *Mannophryne cordilleriana* y su localidad tipo (Tomado de IUCN Red List y Google Earth, 17 de Octubre de 2017).

Captura de ejemplares

El 8 de Julio de 2017 se visitó la localidad tipo de la especie, se capturaron con malla de mano cincuenta y dos renacuajos en estadios 25-26 de Gosner (1960) (Apéndice 1) y un macho con dieciséis renacuajos en el dorso que depositó las larvas dentro del larvario dos días después de su captura.

Durante la colecta, la quebrada presentaba abundante agua y la mayoría de los renacuajos capturados se encontraban en remansos con corriente moderada ubicados en los bordes de la carretera, formados por acumulación de hojarasca y/o residuos sólidos. Una menor cantidad de renacuajos fue capturada en zonas con mayor corriente de agua y menor profundidad. A las 2:30pm se registró una temperatura del aire de 15,3°C y durante la captura las temperaturas máximas y mínimas fueron 27,7 y 14,5°C respectivamente. La humedad relativa fue de 85% (intervalo: 44-89%) y la temperatura del agua de la quebrada fue de 16°C.

Una vez capturados, los renacuajos fueron trasladados a las instalaciones de cría *ex situ* del Centro de Conservación de Reptiles y Anfibios Andinos Venezolanos (CC-RAAV) del Parque Zoológico Chorro de Milla en la Ciudad de Mérida, el cual cuenta con la autorización emitida por el Ministerio del Poder Popular para el Ecosocialismo y Aguas número DGDB- 0002 para el mantenimiento de anfibios amenazados en condiciones de cautiverio. Para ello se utilizó un contenedor plástico de 30x19x20 cm (largo x ancho x profundidad), rodeado de envases con gel frío que permitían mantener una temperatura similar a la de la localidad de captura durante el traslado.

Una vez en el centro de cría, permanecieron dos días bajo observación para descartar a aquellos individuos que presentaran alteraciones (enfermedades, malformaciones o alteraciones de conducta) o que hubieran sufrido algún tipo de impacto durante el traslado. Por falta de reactivos no se pudo tomar muestras de los renacuajos para descartar la presencia del patógeno *B. dendrobatidis* en la población, lo cual era recomendable porque la acción del hongo puede afectar los resultados y se han reportado individuos de esta especie infectados (La Marca, 2005).

Cría en cautiverio

La cría *ex situ* se llevó a cabo bajo los protocolos del CC-RAAV (La Marca, 2014) basados parcialmente en Poole y Grow (2012) y complementados con los protocolos de Hernández (2015) y Székely (2017).

Para la cría de los renacuajos se utilizaron contenedores plásticos de 30 x 20 x 15 cm como larvarios, los cuales fueron ubicados bajo techo cerca de una fuente externa de luz natural. Según las recomendaciones de Székely (2017), fueron rotados aleatoriamente con cada cambio de

agua para evitar efectos sistemáticos pero no controlados en el desarrollo de los renacuajos debidos a la posición de cada larvario con respecto a la fuente natural de luz y calor (Figura 6).

Por tratarse de renacuajos de ambientes lóticos (Duellman y Trueb, 1986), se suministró aireación continua a cada larvario a través de mangueras plásticas conectadas a cinco bombas de aire eléctricas no sumergibles, marca BOYU® U-9900. Para el mantenimiento de la calidad del agua y la difusión de su contenido de cloro a la atmósfera, el agua que se utilizaba para cada larvario era tomada de un contenedor plástico de 70 L de capacidad que se mantenía continuamente aireado. Adicionalmente, el agua se trataba con productos comerciales antihongos, antibacteriales y anticloro marca Kantal® (Figura 6).

Como alimento se utilizaron vainitas (*Pisum sativum*) cocidas y deshidratadas en forma de hojuelas. Este material fue muy exitoso en experimentos previos realizados en el CC-RAAV porque no se desintegra con tanta facilidad como el alimento para peces y produce una menor cantidad de residuos en el agua (E. La Marca y M. Castellanos, en prep.) (Figura 6). Cada renacuajo fue alimentado dos veces por semana con una hojuela con dimensiones de largo y ancho similares a las de su cuerpo. Para minimizar la acumulación de excretas y residuos de alimento, el agua de los larvarios se cambiaba por completo dos veces por semana, es decir, cada tres y cuatro días.

Cuando los renacuajos alcanzaban el estadio 41 de Gosner (apéndice 1), es decir, cuando estaban por culminar el proceso de desarrollo larval, se colocaban rocas planas dentro de los larvarios para que los metamorfos pudieran trepar y evitaran morir ahogados. Cuando alcanzaban el estadio 42 de Gosner (1960), es decir, cuando tenían las cuatro extremidades desarrolladas (metamorfos), eran traspasados de larvarios a vivarios, los cuales consistían en contenedores plásticos de 30 x 19 x 20 cm con tapa de seguridad que evitaban que los metamorfos se escaparan por los bordes de las tapas. A cada vivario se le agregaba 200 ml de agua y se posicionaba de

manera inclinada para proveer al menos una parte del fondo seca. Durante esta etapa los individuos no se alimentaban debido a que se encontraban en proceso de reabsorción de la cola.

Adicionalmente, se tomaron registros de temperatura y humedad relativa del aire utilizando un termohigrómetro CASIO® DQ-950 y registros de temperatura del agua utilizando un termómetro de mercurio (precisión ± 1 °C) para comparar las condiciones ambientales del centro de cría con las de la localidad de origen.



Figura 6. Cría de *Mannophryne cordilleriana* en el CC-RAAV. (A) Larvários con suministro de aire; (B) Vivario; (C) Productos para el mantenimiento del agua; (D) Vainitas cocidas en forma de hojuelas; (E) Renacuajos alimentándose durante los dos primeros días de observación.

Diseño Experimental

Se repartieron aleatoriamente cuatro renacuajos en cada larvario para un total de sesenta y cuatro renacuajos repartidos en dieciséis larvários. Para evitar pseudoreplicación, cada larvario fue tomado como una unidad muestral y cada renacuajo como una sub-muestra. Sin embargo, la

mortalidad fue tan baja, que para la supervivencia se utilizó el número total de individuos vivos y muertos.

A pesar que cuatro renacuajos por larvario es un número bajo que dificulta la realización de un buen análisis estadístico y que con este número de sub-muestras cada muerte representa una pérdida importante, aumentar tan solo un renacuajo más por larvario representaba necesitar dieciséis renacuajos más para el experimento, lo cual estaba limitado por tratarse de una especie en peligro de extinción. Se decidió tener un mayor número de réplicas en lugar de un mayor número de sub-muestras y de esta manera asegurar una potencia estadística más robusta. Además si en alguno de los larvarios se esparcía alguna infección o enfermedad hubiese generado una mayor mortalidad de individuos al tener un mayor número de sub-muestras.

Para evaluar el efecto de la desecación se aplicaron dos tratamientos (cada uno provisto de ocho larvarios). En el tratamiento control se mantuvo un volumen constante de 4 L de agua por larvario desde el inicio hasta el final del experimento. El otro tratamiento (experimental) inició igualmente con un volumen de 4 L de agua, pero se eliminó dos veces por semana 500 ml de cada larvario, hasta que en la cuarta semana del experimento, el volumen de agua de los larvarios era de 1 L. Seguidamente, se redujeron 50 ml dos veces por semana hasta alcanzar un volumen final de 100 ml en la octava semana del experimento. Se esperaba mantener dicho volumen hasta el final del experimento, pero debido a evaporación, el volumen de 100 ml se reducía, formándose áreas secas dentro de cada larvario, en las cuales murieron algunos individuos. Debido a este inconveniente, el volumen final fue ajustado a 200 ml en la semana siguiente (Tabla 1 y Figura 7).

En el CC-RAAV se ha observado que, en promedio, los renacuajos de *Mannophryne urticans* completan su desarrollo larval y comienzan la metamorfosis en 117 días (4 meses) y los de *M. collaris* en 85 días (3 meses) pero en ambas especies el tiempo de desarrollo ha sido altamente

variable (Castellanos, M.; La Marca. E. en prep.). Hernández (2015) también reportó que en cautiverio el tiempo de desarrollo de renacuajos de *M. vulcano* es variable y que algunos individuos incluso culminan el desarrollo larval y comienzan la metamorfosis al mes de haber comenzado su cría.

Teniendo en cuenta el tiempo de desarrollo de *M. urticans* y de *M. collaris*, se estimó que el tiempo de desarrollo larval de *M. cordilleriana* podía durar aproximadamente 3 meses y medio pero se consideró que algunos individuos podían tener un desarrollo más rápido al igual que los de *M. vulcano*. Debido a esto y siguiendo el diseño experimental de Székely (2017), en el tratamiento experimental, se redujo rápidamente el volumen de agua durante el primer mes para producir una fuerte señal de desecación antes de que los renacuajos comenzaran la metamorfosis, y durante el siguiente mes la reducción fue más lenta para dar suficiente tiempo a los renacuajos para completar la metamorfosis (Tabla 1). Este régimen de reducción del nivel de agua emuló la desecación natural de pozas durante los meses más secos. Se consideró que 1 cm de profundidad (200 ml) puede ser muy estresante para los renacuajos porque la profundidad máxima de las pozas registrada el día de la colecta fue de 8 cm y la mínima de 2 cm y debido a que a una menor profundidad se forman parches secos en los que pueden morir los individuos.

Debido a que el tiempo de desarrollo de los renacuajos bajo el tratamiento experimental superó el tiempo estimado para ambos tratamientos, luego de que todos los individuos del control culminaron la metamorfosis y antes de que el grupo experimental iniciara la metamorfosis, se volvió a aumentar el volumen de agua del tratamiento experimental para evaluar si se aceleraba el proceso de desarrollo (Tabla 1).



Figura 7. Renacuajo muerto en parche seco del larvario por exceso de reducción del volumen de agua.

Tabla 1. Régimen de reducción del volumen de agua y sus profundidades asociadas.

Fecha	Semana	Vol inicial (ml)	Vol final (ml)	Disminución (ml)	Profundidad (cm)
10/7/2017	1	4000	4000	0	7,6
13/7/2017	1,5	4000	3500	500	6,9
17/7/2017	2	3500	3000	500	6,2
20/7/2017	2,5	3000	2500	500	5,5
24/7/2017	3	2500	2000	500	4,8
27/7/2017	3,5	2000	1500	500	4,1
31/7/2017	4	1500	1000	500	3,4
3/8/2017	4,5	1000	500	500	2,7
7/8/2017	5	500	450	50	2,0
10/8/2017	5,5	450	400	50	1,8
14/8/2017	6	400	350	50	1,6
17/8/2017	6,5	350	300	50	1,4
21/8/2017	7	300	250	50	1,2
24/8/2017	7,5	250	200	50	1,0
28/8/2017	8	200	150	50	0,8
31/8/2017	8,5	150	100	50	0,6
18/9/2017	11	100	200	-	1,0
9/11/2017	18,5	200	4000	-	7,6

Browne y Zippeli (2007) consideran altas densidades a partir de 40 renacuajos de tamaño mediano por litro de agua, por lo tanto tomando 20 renacuajos por litro como el equivalente a 4 renacuajos en 200 ml, se consideró que la densidad de individuos del experimento era baja (Figura 8). La muerte de alguno de los renacuajos dentro de cada larvario generaba una disminución de la

densidad; a nivel de disponibilidad de alimento esto no generaba ningún efecto debido a que el alimento era proporcionado por individuo y no por larvario. A nivel de espacio, se consideró que debido a que el tamaño de cada renacuajo representaba menos de 0,5% del espacio disponible y a que no formaban escuelas, el aumento de 16 ml por individuo con la muerte de algún otro no producía ningún efecto significativo, por lo tanto no se modificó el volumen cuando algún renacuajo moría.



Figura 8. (A) Alta densidad de renacuajos según Browne y Zippeli (2007); (B) Densidad de renacuajos durante la cría de *M. cordilleriana* en este estudio.

Recolección de datos

Crecimiento:

Semanalmente se tomaron en los renacuajos las medidas longitud del cuerpo y de la cola (longitud total menos longitud del cuerpo de la Figura 9) según los estándares de Duellman (1970) y Mijares-Urrutia (1998). Con la suma de ambas se estimó la longitud total. Cuando los metamorfos culminaron la reabsorción de la cola (estadio 46 de Gosner) se midió la longitud rostro – cloacal de los mismos. Cada renacuajo se colocó en una cápsula de Petri con poca agua, de manera que su cuerpo estuvo cubierto y su movilidad reducida. La longitud del cuerpo se tomó dorsalmente para obtener una mayor precisión (Figura 10), mientras que la longitud de la cola se tomó lateralmente para poder observar el tubo cloacal y la punta de la cola. Para dichas

mediciones se utilizó un vernier HELIOS® ($\pm 0,05\text{mm}$) y una lupa de mano. No se utilizó una lupa de mesa debido a que la luz no era suficiente para poder observar con claridad a los individuos, y al utilizar una fuente de luz externa los renacuajos nadan en búsqueda de sombra. Por otra parte, la lámpara externa genera gran cantidad de calor, lo cual podía afectar negativamente a los renacuajos.

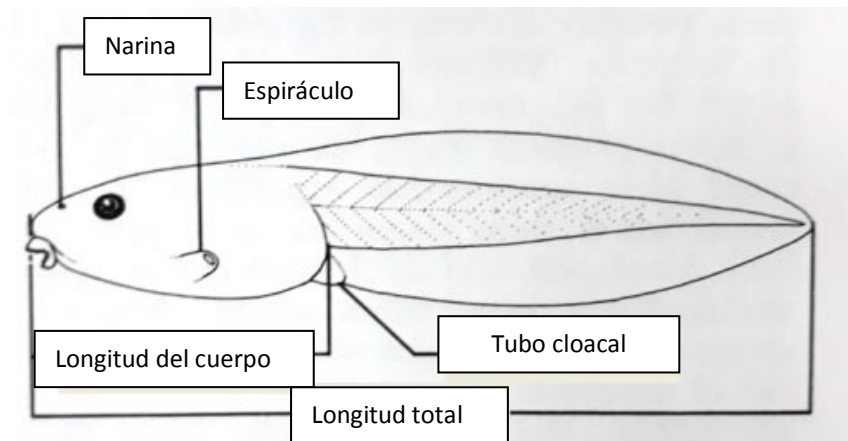


Figura 9. Esquema de medidas corporales de renacuajos (basado en Duellman, 1970).

A pesar que la masa corporal es una variable importante para evaluar crecimiento, esta no pudo ser medida debido a que los renacuajos eran muy pequeños y no se contaba con una balanza de 0,001 g de precisión.

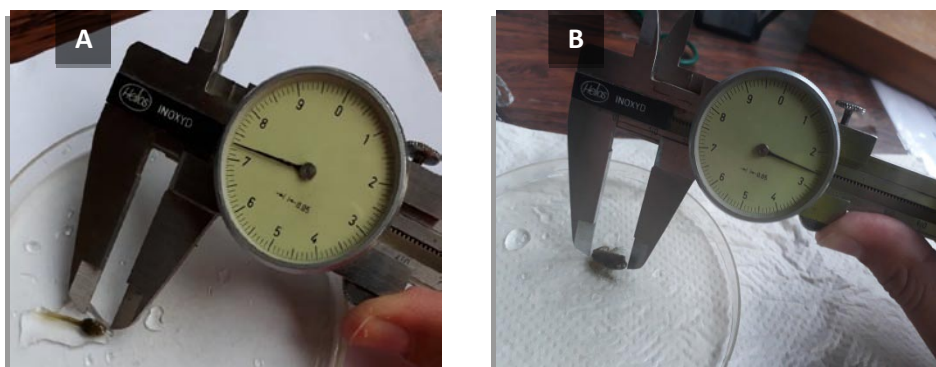


Figura 10. Medición de renacuajo (A) y metamorfo (B) de *M. cordilleriana*.

Tiempo de desarrollo:

Debido a la dificultad para identificar el estadio en el que se encontraba cada individuo, se definieron cuatro grupos con base en la tabla de estadios de Gosner (1960) (Apéndice 1), los cuales podían ser identificados utilizando una lupa de mano o a simple vista: grupo 1: individuos sin extremidades o con extremidades posteriores pero sin todos los dígitos diferenciados (26 - 36 G), grupo 2: individuos con extremidades posteriores con todos los dígitos diferenciados y sin extremidades anteriores visibles (37 - 41 G), grupo 3: individuos con 4 extremidades visibles (metamorfos, 42 - 45 G) y grupo 4: postmetamorfos (individuos que culminaron la reabsorción de la cola, 46 G) (Apéndice 1). Semanalmente se evaluaba en qué grupo se encontraban los individuos y además, se registró el día exacto en el que cada renacuajo alcanzó los estadios 42 y 46 de Gosner (1960) para de esta manera determinar el tiempo de desarrollo larval (desde estadio 25 a 42) y de metamorfosis (desde estadio 42 hasta 46) de cada uno.



Figura 11. Individuos de *M. cordilleriana* con distintos grados de desarrollo.

Supervivencia:

Se llevó un registro diario de aquellos individuos que morían para evaluar la supervivencia en cada tratamiento. Los individuos muertos se extrajeron inmediatamente de los larvarios o vivarios y se registró una descripción de su aspecto externo a fin de establecer posibles causas de muerte.

La recolección de datos de cada individuo se realizó hasta que cada uno culminó la metamorfosis y el experimento finalizó cuando el último individuo culminó la metamorfosis.



Figura 12. Postmetamorfos de *M. cordilleriana*

Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico PAST versión 2.17c (Hammer y col., 2001).

Crecimiento:

Se hizo mayor énfasis en las tallas alcanzadas al momento de finalizar la etapa de desarrollo larval y al finalizar la metamorfosis ya que dichas tallas pueden ser determinantes en la

supervivencia de los individuos al abandonar las pozas. Para evaluar la variabilidad interna dentro de cada tratamiento, se estimó el coeficiente de variación de la longitud del cuerpo, longitud de la cola y longitud total en el estadio 42 y de la longitud rostro-cloacal en el estadio 46. De esta manera, se determinó el grado de dispersión entre las réplicas con respecto al promedio (Daniel, 2009). Para evaluar si a lo largo del tiempo se mantenía un mismo orden de tamaño entre los larvarios; es decir, si algún larvario contenía siempre a los renacuajos más grandes o a los más pequeños, y para indagar si en alguna semana en particular el crecimiento de algún larvario había sido alterado, se calcularon correlaciones entre el orden de los larvarios en la longitud corporal promedio entre semanas. Correlaciones positivas y significativas indican que el orden de tamaño promedio se mantiene entre dos semanas distintas. Otros valores de correlación indican que el orden de tamaños cambian al azar con el tiempo o bien se invierte, es decir, que un mismo larvario puede tener los renacuajos más grandes o más pequeños en distintas semanas no consecutivas.

Debido a que el tamaño muestral es pequeño ($n=8$), para comparar las medias de longitud de ambos tratamientos y determinar la variabilidad entre tratamientos se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney con un nivel crítico de $\alpha = 0,05$ (véase Hammer y col. 2001). Para apreciar visualmente las diferencias, se realizaron para ambos tratamientos, histogramas de distribución de frecuencias de las longitudes de los individuos.

Las mediciones semanales se utilizaron para construir curvas de crecimiento. Puesto que la longitud corporal (que excluye la longitud de la cola) presentó menor grado de dispersión y biológicamente es una medida más representativa del estado y del crecimiento del individuo, fue la variable utilizada para construir las curvas de crecimiento. Los datos de la etapa de crecimiento se ajustaron a una curva logística ya que esta presentó un mejor ajuste según el criterio de

información de Akaike. Se compararon las tasas de crecimiento del tratamiento control y del tratamiento de disminución utilizando el intervalo de 95% de confianza de la pendiente de cada curva.

Tiempo de desarrollo:

Para evaluar la variabilidad interna se utilizaron los coeficientes de variación del tiempo de desarrollo y de metamorfosis de cada tratamiento. Para evaluar la variabilidad entre tratamientos se comparó la duración del desarrollo y de la metamorfosis bajo ambos tratamientos utilizando una prueba U de Mann-Whitney. Para apreciar visualmente dicha variabilidad, se realizaron histogramas de distribución de frecuencias de ambas variables. Adicionalmente, con los datos de la duración completa del proceso de desarrollo y metamorfosis, se construyeron curvas Kaplan-Meier. En cada semana las muertes fueron representadas como eventos de tipo cero y las culminaciones de la metamorfosis como eventos tipo uno. Con estos datos se graficó la probabilidad de que los individuos se mantuvieran en proceso de desarrollo a través del tiempo. Posteriormente se utilizó una prueba log-rank para comparar las curvas entre tratamientos (Hammer, 2001). Para evaluar el grado de desarrollo de los individuos a través del tiempo en cada tratamiento, se realizó un histograma de la distribución de individuos en cada grupo de estadios a través del tiempo. Posteriormente se realizaron pruebas X^2 de Pearson dentro de cada semana para determinar si la distribución de frecuencias de cada grupo de estadios difería entre tratamientos.

Supervivencia:

Se graficó el número total de individuos muertos bajo cada tratamiento y se graficaron las posibles causas de muerte de los individuos de cada tratamiento. Como la mortalidad fue baja, no se pudo realizar una curva de supervivencia a través del tiempo que permitiera comparar las tasas de supervivencia entre tratamientos.

Resultados

Los registros ambientales demostraron que las temperaturas del aire del CC-RAAV son mayores que las registradas en la estación climatológica Las Piedras. Las temperaturas máximas y mínimas oscilaron entre 25,84 y 34,3°C y entre 15,4 y 17,62°C respectivamente, y la temperatura promedio entre 21 y 25°C (Figura 13). En promedio, la temperatura en el CC-RAAV aumentó a lo largo del tiempo, registrándose temperaturas mayores que 30°C a partir de Noviembre. Por el contrario, la humedad relativa disminuyó en el mismo lapso, concordando con el patrón biestacional de la región. La humedad relativa media máxima fue 87%, la mínima 39% y la humedad relativa promedio osciló entre 72 y 60% (Figura 13). Sin embargo, a pesar de las fluctuaciones de la temperatura del aire, la temperatura del agua se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo y fue muy similar a la reportada por La Marca (1994) y Doreste (2014). En ambos tratamientos la temperatura del agua osciló entre 19 y 21°C y la máxima diferencia entre la temperatura del agua de cada tratamiento fue de 1 °C (Figura 13).

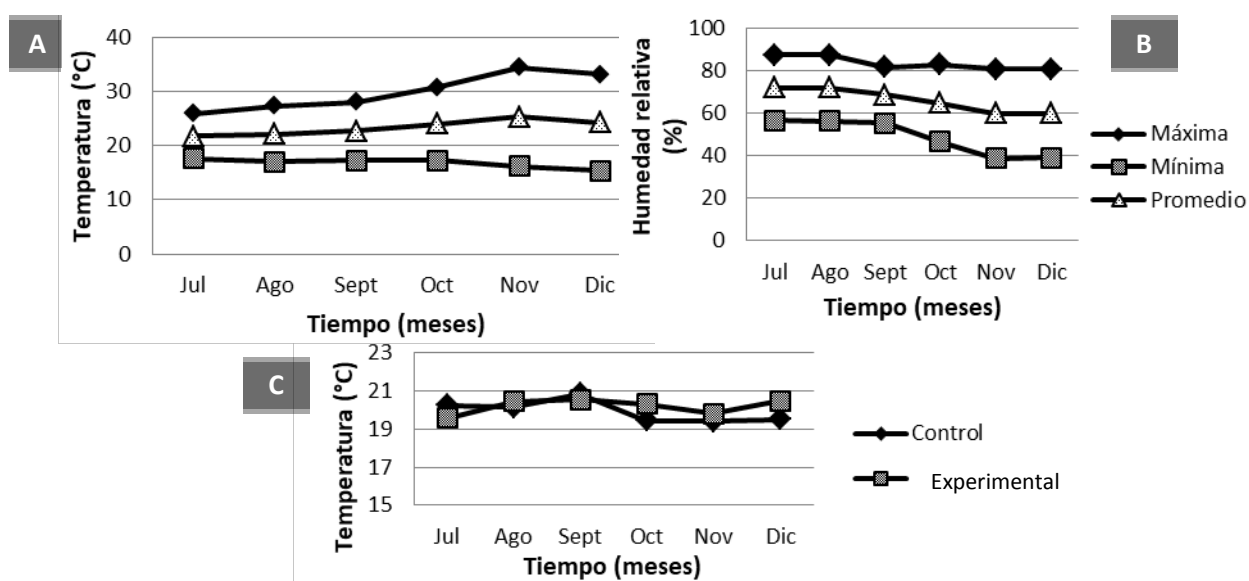


Figura 13. (A) Temperatura del aire. (B) Humedad relativa del aire. (C) temperatura del agua de los larvarios durante los meses de experimentación*. *Se excluye el mes de Enero (2018) por falla del termohigrómetro.

Crecimiento

Dentro de cada tratamiento se registraron pocas variaciones en el tamaño de los renacuajos, tanto al culminar el proceso de desarrollo larval (G42) como al culminar el proceso de metamorfosis (G46), presentando bajas desviaciones estándar en todos los casos (<10%) (Tabla 2). La variable “longitud del cuerpo” presentó menor desviación que la longitud de la cola y la longitud total, por lo cual, es la medida externa que permite evaluar mejor el efecto de cada tratamiento sobre el tamaño de los renacuajos al culminar el desarrollo larval.

En cuanto a las correlaciones intra-tratamiento entre el orden de longitud promedio de los larvarios entre distintas semanas se observó lo siguiente: de las 153 correlaciones posibles en el control entre semanas, solo 8 fueron positivas y significativas y de ellas solo la mitad fueron entre semanas consecutivas. Asimismo, de las 172 correlaciones posibles en el tratamiento experimental, solo 10 fueron positivas y significativas y de ellas solo 4 fueron de semanas consecutivas (Tabla 3). Estos resultados muestran que dentro de cada tratamiento no hubo ningún larvario con valores extremos en de crecimiento (bajos ni altos), lo cual equivale a decir que el crecimiento en los larvarios de un mismo tratamiento fue muy similar. Por tanto, se puede considerar que todos los larvarios de un mismo tratamiento se comportan como una misma población. Debido a estos resultados, se consideró a cada individuo como unidad muestral y los resultados obtenidos de esta manera fueron muy similares a los obtenidos al tomar cada larvario como unidad muestral.

Al alcanzar el estadio 42 de Gosner, el tamaño de los renacuajos fue muy similar entre los tratamientos, pero, al culminar la metamorfosis (Tabla 2), los postmetamorfos del tratamiento experimental fueron significativamente más pequeños.

Tabla 2. Medidas externas promedio dentro de cada tratamiento. * $p < 0,05$

Medida externa	Tratamiento experimental			Tratamiento control		
	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
Longitud del cuerpo (G42) (mm)	11,45	0,50	4	11,65	0,80	7
Longitud de la cola (G42) (mm)	21,15	1,25	6	20	1,90	9
Longitud total (G42) (mm)	32,60	1,45	4	31,60	2,45	8
Longitud Rostro-Cloacal (G46) (mm)	9,75*	0,20	2	11,25*	0,55	5

Tabla 3. Porcentaje de correlaciones positivas y significativas entre la longitud corporal promedio semanal.

Correlaciones positivas y significativas	Tratamiento	
	Control	Experimental
De todas las posibles correlaciones	5,22%	5,81%
Entre semanas consecutivas	2,61%	2,32%

Complementando los resultados de la prueba U de Mann-Whitney, se puede apreciar a través de los histogramas de la Figura 14 que entre tratamientos, las distribuciones de frecuencias de las variables longitud del cuerpo, longitud de la cola y longitud total de los individuos al alcanzar el estadio G42 se solapan entre sí. Por otro lado, las distribuciones de frecuencias de la longitud rostro-cloacal bajo cada tratamiento no se solapan.

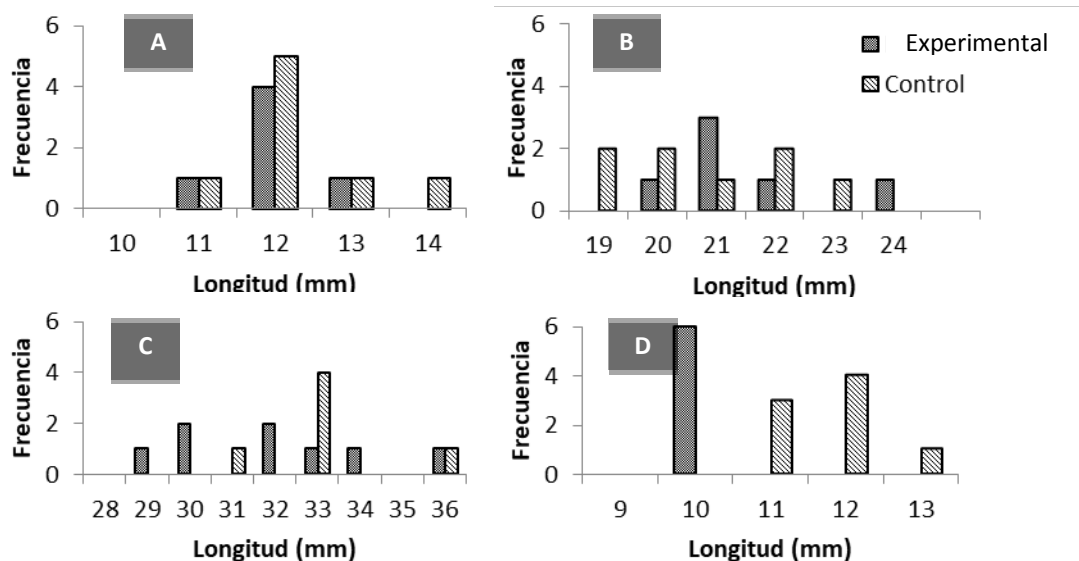


Figura 14. Histogramas de distribuciones de frecuencias de las medidas externas. (A) Longitud del cuerpo. (B) Longitud de la cola. (C) Longitud total. (D) Longitud rostro-cloacal.

Bajo ambos tratamientos, el desarrollo incluyó un período inicial de crecimiento con tendencia exponencial y un período de disminución del tamaño durante el proceso de metamorfosis, el cual fue mucho más pronunciado en la longitud de la cola por reabsorción y por consiguiente en la longitud total (Figura 15).

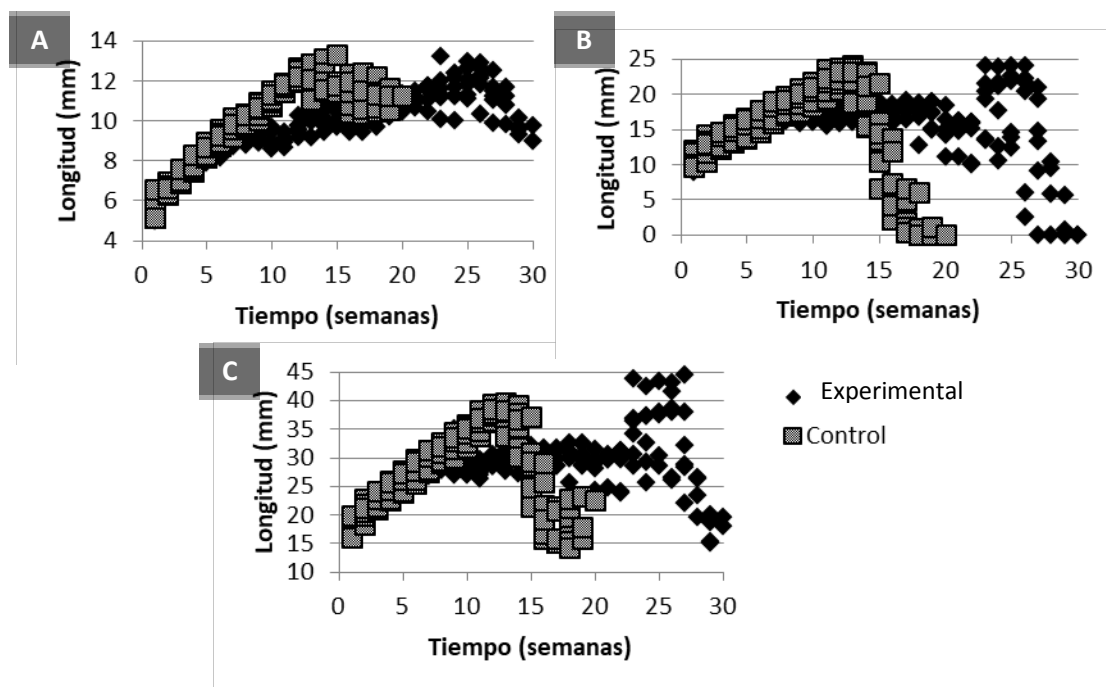


Figura 15. Crecimiento de renacuajos de *M. cordilleriana*. (A) Longitud del cuerpo. (B) Longitud de la cola. (C) Longitud total.

La pendiente de la curva de crecimiento del tratamiento control es más pronunciada que la del experimental, indicando una mayor tasa de crecimiento en los individuos del tratamiento control (Figura 16). Los intervalos de 95% de confianza de las pendientes (c) de ambas curvas no se solapan, indicando diferencias significativas entre ambas (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de las curvas de crecimiento donde: —

Parámetro	Experimental	Control
a	11,11	13,08
b	0,81	1,87
c	0,14	0,25
95% confianza en c	0,09 - 0,15	0,19 - 0,26

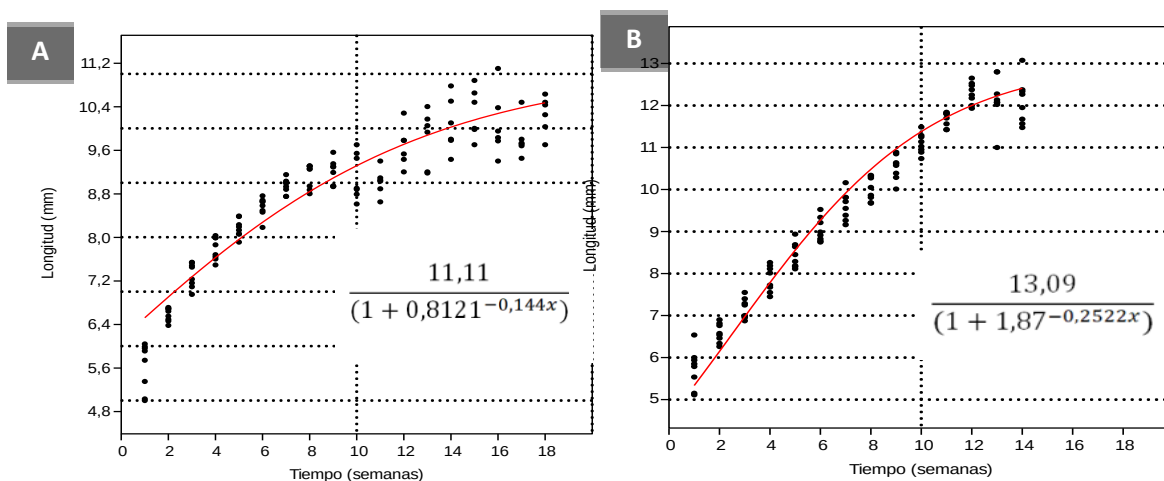


Figura 16. (A) Curva de crecimiento del tratamiento experimental. (B) Curva de crecimiento del tratamiento control.

Tiempo de desarrollo:

La desviación estándar del tiempo de desarrollo de ambos tratamientos fue baja (coeficiente de variación < 10%), indicando una baja variabilidad entre las réplicas; sin embargo, la del tiempo de metamorfosis fue alta en ambos casos (>10%), indicando una alta variabilidad entre el tiempo de metamorfosis de cada réplica (Tabla 5).

El tiempo de desarrollo larval fue significativamente mayor en los individuos sometidos al tratamiento de disminución, mientras que el tiempo de metamorfosis fue significativamente menor que en los individuos del tratamiento control (Tabla 5).

Tabla 5. Duración promedio del tiempo de desarrollo y de metamorfosis en cada tratamiento. * $p < 0,05$.

	Tratamiento Experimental			Tratamiento control		
	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Duración del desarrollo (semanas)	22,80*	1,65	7	14,50*	0,55	4
Duración de la metamorfosis (semanas)	2,50*	0,40	17	3,60*	1,00	28

Las distribuciones de frecuencias de la duración del desarrollo larval y de la duración de la metamorfosis no se solapan entre tratamientos (Figura 17), concordando con las diferencias significativas entre tratamientos (prueba *U* de Mann-Whitney). En particular, entre tratamientos, las distribuciones de frecuencias de la duración del desarrollo larval se encuentran ampliamente alejadas.

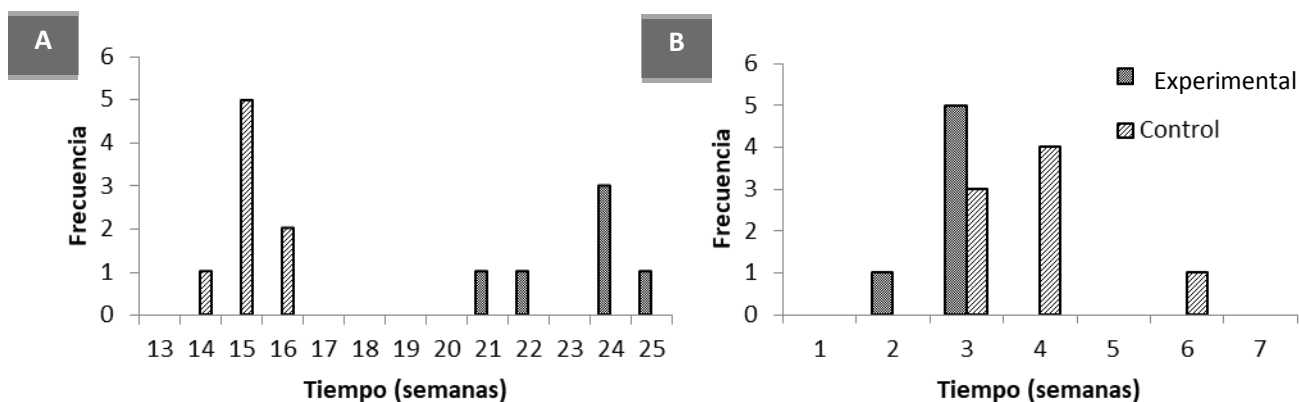


Figura 17. Histogramas de distribuciones de frecuencias. (A) Tiempo de desarrollo. (B) Tiempo de metamorfosis.

La duración del desarrollo fue significativamente diferente entre tratamientos: cuando todos los individuos del tratamiento control habían culminado la metamorfosis, ninguno del tratamiento experimental lo había hecho (Figura 18). Los individuos del tratamiento experimental comenzaron la metamorfosis luego del aumento del volumen de agua y la culminaron diez semanas después que los del tratamiento control.

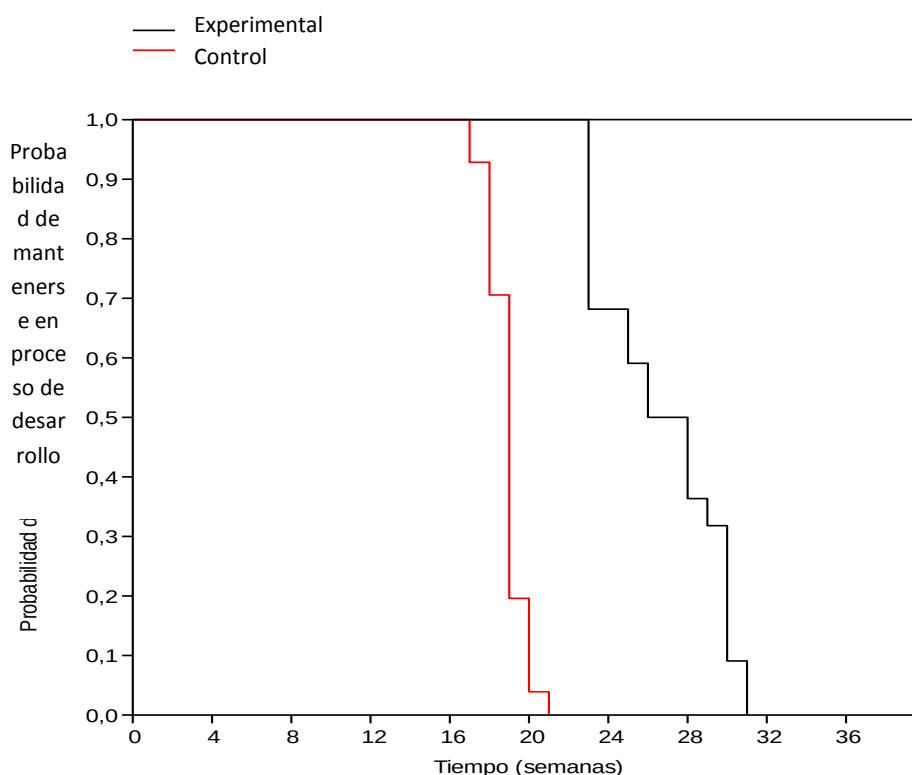


Figura 18. Probabilidad de los individuos de mantenerse en estado larval y metamorfo (de no culminar su desarrollo). p (log-rank) = 0,00001.

Según las pruebas X^2 de Pearson, en las primeras 10 semanas del experimento no hubo diferencias entre tratamientos en la distribución de individuos en los distintos grupos de estadios, ya que, en promedio, la totalidad se encontraba dentro del grupo uno. A partir de la semana 11, las diferencias fueron significativas (Figura 19).

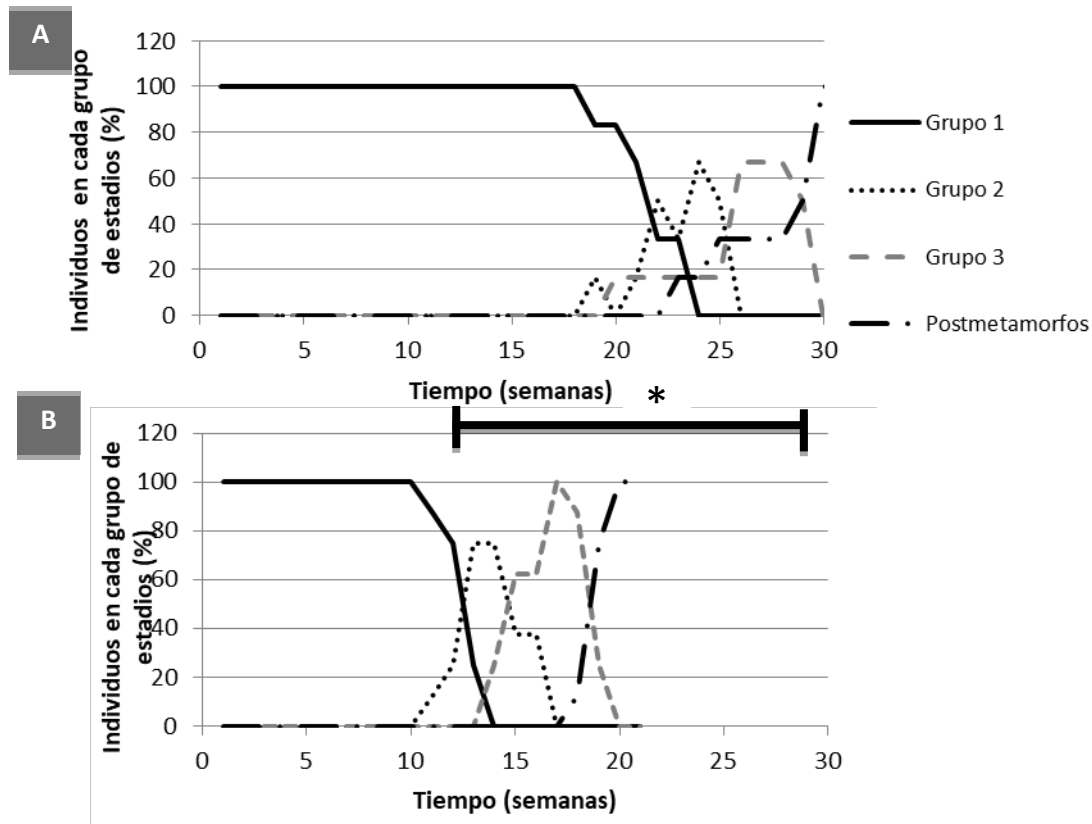


Figura 19. Distribución de individuos en cada grupo de estadios. (A) Tratamiento experimental. (B) Tratamiento control. * Semanas con diferencias significativas en la distribución de individuos ($p < 0,05$).

Supervivencia

En el control murieron 6 individuos, de los cuales 1 era larva y 5 eran metamorfos, mientras que en el tratamiento experimental murieron 10 individuos (9 larvas y 1 metamorfo) (Figura 20).

En el control todos los individuos murieron por causas accidentales, a excepción de un metamorfo con malformaciones en las extremidades posteriores que murió ahogado (Figura 20 y 21). En el tratamiento experimental la mayoría de los individuos murieron por desecación (en parches secos del larvario cuando el volumen de agua era de 100 ml).

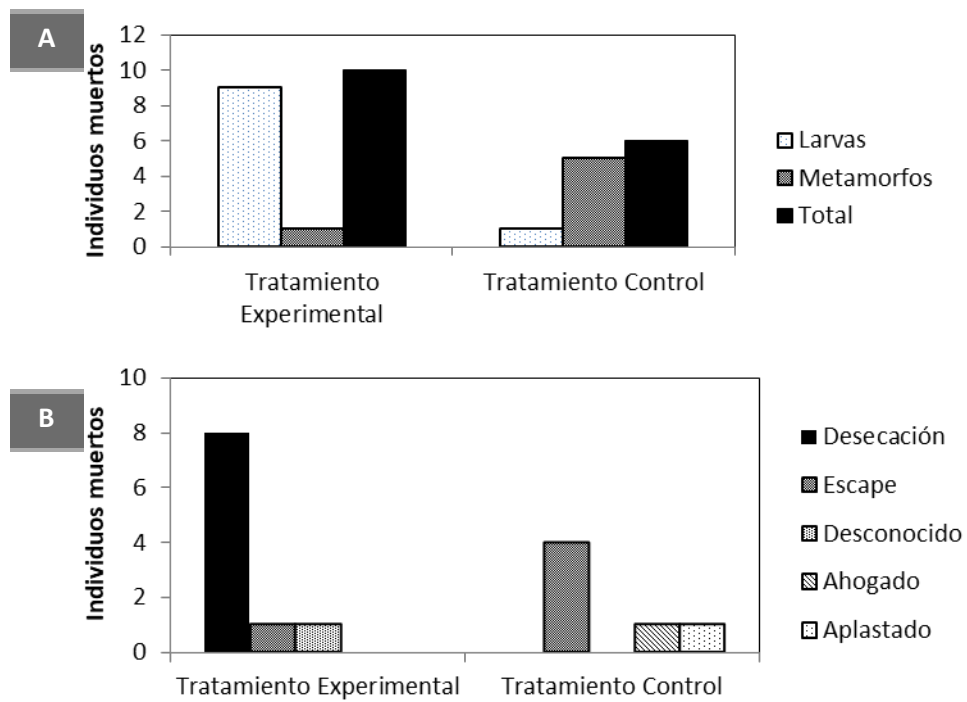


Figura 20. Mortalidad dentro de cada tratamiento (A) Cantidad de individuos muertos. (B) Causas de muerte.



Figura 21. Metamorfo con malformación en las extremidades traseras (no las extendía al saltar).

Observaciones sobre el desarrollo:

A partir de la semana 7, cuando la profundidad del agua en los larvarios del tratamiento experimental era de 1,2 cm, los renacuajos redujeron su alimentación.

Discusión

La longitud de la cola no es la mejor variable para evaluar el crecimiento ya que su medición está sujeta a mayor error aleatorio debido a transparencias y rupturas de la punta de la cola que dificultan su medición y a que según su grado de curvatura la longitud medida es diferente.

La longitud del cuerpo al alcanzar el estadio 42 fue muy similar entre réplicas y entre tratamientos, concordando con los modelos teóricos de Wilbur y Collins (1973) y Day y Rowe (2002; en Richter y col., 2011) los cuales sugieren que los renacuajos alcanzan un tamaño determinado antes de disparar la metamorfosis.

Los individuos bajo el tratamiento de disminución del volumen de agua alcanzaron el estado postmetamórfico con menor tamaño corporal, lo cual puede conllevar a juveniles con menor capacidad locomotora (Goater y col., 1993; Richter-Boix y col., 2006; en Székely y col., 2010), menor tolerancia a la desecación (Newman y Dunham, 1994; en Székely y col., 2010), resistencia reducida a parásitos (Goater, 1994; en Székely y col., 2010), sistema inmune más débil (Gervasi y Foufopoulos, 2008; en Székely y col., 2010) y en general menor supervivencia (Reques y Tejedo, 1997; Morey y Reznick, 2001; Altwegg y Reyer, 2003; en Székely y col., 2010). Además puede afectar su éxito reproductivo al llegar a la etapa adulta (Smith, 1987; Howard, 1988; Scott, 1994; en Székely y col., 2010). El efecto de reducción sobre la tolerancia ante la desecación, resistencia a parásitos y fortaleza del sistema inmune es sumamente crítico en esta especie debido a que los períodos secos extremos, la presencia de nemátodos por altos niveles de contaminación y la posible presencia del hongo *B. dendrobatidis* en la población son unas de las principales amenazas que enfrenta en condiciones silvestres (La Marca, 2005; Molina y col., 2009; Sánchez, 2010).

La tasa de crecimiento de los individuos del tratamiento de disminución fue más baja que la de los del tratamiento control, lo cual puede adjudicarse a su comportamiento. Los renacuajos del tratamiento control usualmente nadan tanto horizontal como verticalmente a lo largo y ancho de los larvarios y pueden ser observados mientras se alimentan, mientras que los renacuajos del tratamiento de disminución del volumen de agua suelen permanecer inmóviles en los bordes de los larvarios y nunca fueron observados alimentándose. La cantidad de restos alimenticios no consumidos permite afirmar que los renacuajos del tratamiento experimental se alimentaron menos a partir de 1,2 cm de profundidad de agua, lo cual pudo haber reducido su tasa de crecimiento.

Bajo el tratamiento de disminución del volumen de agua los individuos no alcanzaron la talla mínima necesaria para culminar la etapa de desarrollo larval. Fue a partir de la restitución del volumen de agua a sus condiciones iniciales cuando los renacuajos aceleraron su desarrollo y comenzaron la metamorfosis.

Contrariamente a lo que sucede con especies de pozas temporales, las cuales bajo riesgo de desecación suelen culminar su desarrollo en lapsos más cortos a expensas de un menor tamaño corporal (Richter y col., 2011; Székely y col. 2017), bajo reducción del volumen de agua los renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* se desarrollan lentamente o no se desarrollan (no se determinó ya que se restituyó el volumen de agua a sus condiciones iniciales). Esto puede deberse a que en general, las especies de pozas temporales comienzan la metamorfosis al alcanzar un menor tamaño corporal en comparación con el que deben alcanzar las especies de pozas permanentes (Ritcher y col. 2011). Tomando en cuenta esto y debido a que la tasa de crecimiento de los renacuajos bajo disminución del volumen de agua es más lenta, se tardan aún más en alcanzar el tamaño mínimo necesario para comenzar la metamorfosis.

Por otro lado, en ambos tratamientos la duración de la metamorfosis fue más corta que la del desarrollo larval, lo cual se asocia a que la selección actúa minimizando la duración de la metamorfosis con respecto a la duración del desarrollo larval, ya que ésta es una etapa altamente vulnerable donde los anuros no pueden desempeñarse con su máxima eficiencia en el ambiente acuático ni tampoco en el terrestre (Wassersug y Sperry, 1997 en Downie y col. 2004). Adicionalmente a esto, los individuos del tratamiento experimental culminaron la metamorfosis más rápido que los del tratamiento control.

La supervivencia en el tratamiento experimental disminuyó drásticamente al reducir el volumen de agua al mínimo (100ml). En dos semanas murieron 28% de los individuos, evidenciando que bajo condiciones de sequía extrema, los renacuajos pueden quedar atrapados en parches secos y morir. Dicha cifra puede incrementar si las condiciones de sequía se prologan, pudiendo traer consecuencias negativas significativas en la población.

Descartando el efecto de la disminución del volumen de agua, al igual que en la cría en cautiverio de *Mannophryne vulcano* (Hernández, 2015), la supervivencia de *M. cordilleriana* en cautiverio fue alta, la mayoría de las muertes fueron por error humano y no por causas naturales ni por efectos del tratamiento (a excepción de los individuos que murieron por desecación).

La temperatura del agua del CC-RAAV resultó muy similar a la de la localidad de origen, por lo tanto se considera que no ejerció efecto significativo durante el proceso de desarrollo. De igual forma, la máxima diferencia en temperaturas medias entre tratamientos fue solo de 1°C y no fue constante a lo largo del tiempo, por la tanto no se evidencian grandes diferencias de temperatura entre tratamientos. Sin embargo, si la temperatura del aire no ha variado significativamente desde 1983, tanto la temperatura promedio mensual del CC-RAAV como las máximas y mínimas fueron mayores que las registradas por la Estación Las Piedras para el período

1969-1983. Según Downie y col (2004), esto pudo haber alargado o acortado la duración de la metamorfosis de los renacuajos criados en el CC-RAAV con respecto a la de los individuos en vida silvestre; sin embargo, como ambos tratamientos estuvieron sometidos a la misma temperatura, las diferencias en la duración de la metamorfosis entre tratamientos no fueron producto de la temperatura.

La respuesta de los renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* ante la desecación es muy distinta a la de las especies de las familias Alytidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Bufonidae, Hylidae y Ranidae. Esto se corresponde con los resultados de Downie y col. (2004), quienes compararon la duración de la metamorfosis de catorce especies de las familias Pipidae, Bufonidae, Aromobatidae, Hylidae y Leptodactylidae, incluyendo *Mannophryne trinitatis*, obteniendo que esta especie tiene un patrón muy distinto al resto con respecto a la correlación entre el tamaño del cuerpo, el tamaño de la cola, la masa corporal y la metamorfosis. La ecología y fisiología de *Mannophryne* puede ser muy diferente a la de los géneros comúnmente estudiados, realzando la necesidad de investigación de dichas especies, en su gran mayoría venezolanas.

El tiempo de desarrollo de *Mannophryne cordilleriana* fue mayor que el de *M. collaris*, *M. urticans* y *M. vulcano*. En condiciones silvestres un desarrollo lento puede influir negativamente en la supervivencia de renacuajos si las pozas llegasen a secarse por completo en los tres meses más secos del año. Si logran sobrevivir, las condiciones de estrés podrían traer como consecuencia postmetamorfosis con un menor tamaño corporal, restándoles capacidad de supervivencia y reproducción en las etapas subsiguientes. Se puede considerar que si las condiciones naturales de sequía son exacerbadas por el desarrollo de actividades humanas, y si las poblaciones de *M. cordilleriana* no son capaces de reproducirse exitosamente durante la temporada de lluvias, esto puede convertirse en una amenaza para la especie.

Según los resultados obtenidos, se puede deducir que en cuanto a especies como *Aromobates meridensis* y *A. zippeli*, cuyas poblaciones se encuentran en malas condiciones y cuyo hábitat se ve más afectado por sequías extremas, el efecto negativo de la desecación puede ser aún mayor y amenazar aún más la existencia de dichas especies. Se hace necesario desarrollar estudios similares bajo condiciones experimentales controladas con estas especies para determinar si tienen una respuesta similar a la de *M. cordilleriana* en cuanto a la duración del desarrollo larval y metamorfosis.

Conclusiones

A diferencia de otras especies previamente estudiadas, los renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* no responden ante la desecación acelerando su desarrollo. Bajo condiciones de desecación simuladas en laboratorio, la tasa de crecimiento de renacuajos de *Mannophryne cordilleriana* es baja, trayendo como consecuencia un desarrollo lento.

Si la tasa de reducción del volumen de agua es alta, los individuos pueden morir por desecación. Si sobreviven antes de que la poza se seque, culminan la metamorfosis más rápido pero a expensas de un menor tamaño corporal.

Si en los Andes venezolanos las estaciones secas se intensifican y se prolongan debido al desarrollo de actividades humanas, y según la importancia que tenga la reproducción durante dichos períodos secos sobre la dinámica poblacional, las poblaciones de *Mannophryne cordilleriana* y posiblemente especies filogenéticamente cercanas como *A. meridensis* y *A. zippeli*, que ya se encuentran en peligro de extinción, podrían verse afectadas negativamente.

Recomendaciones

Debido a la respuesta de *Mannophryne cordilleriana* ante la desecación, se recomienda realizar este experimento en otras especies de anuros de ambientes lóticos para evaluar si dicha respuesta es propia del género, de la familia o de especies de ambientes lóticos. Adicionalmente, se recomienda incluir mayor variabilidad de tratamientos (diferentes patrones de disminución del volumen de agua) para evaluar si el grado de desarrollo en el cual se encuentren los individuos cuando se induzcan las señales de desecación influye en la respuesta de los individuos.

En cuanto al efecto de la desecación sobre poblaciones silvestres de *Mannophryne cordilleriana* se recomienda llevar a cabo investigaciones *in situ* para evaluar qué porcentaje de la población se ve afectado durante las estaciones secas, para establecer si es necesario implementar proyectos de conservación con esta especie, si son factibles y qué estrategias pueden ser más eficientes.

Bibliografía

- Altwegg, R., Reyer, H. (2003): Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57: 872-882.
- Aranguren, A.; Andressen, R.; Henao, A.. 2012. El clima estacional del cinturón montano en el estado Mérida-Venezuela. *Revista Geográfica Venezolana*, 53(2), 187-212.
- Barrio – Amorós, C.L; Santos, J.C. 2012. A phylogeny for *Aromobates* (Anura: Dendrobatidae) with description of three new species from the Andes of Venezuela, taxonomic comments on *Aromobates saltuensis*, *A. inflexus* and notes on the conservation status of the genus. *Zootaxa* 3422: 1-31.
- Berger, L.; Speare, R.; Daszak, P.; Green, D. E.; Cunningham, A. A.; Goggin, C. L.; Slocombe, R.; Ragan, M. A.; Hyatt, A. D.; McDonald, K. R.; Hines, H. B.; Lips, K. R.; Marantelli, G.; Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforest of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 9031-9036.
- Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv. Genet.* 13, 115–155.
- Browne, R. K; Zippel, K. 2007. Reproduction and larval rearing of amphibians. *ILAR Journal*, 48 (3): 214-234.
- Daniel, W. 2009. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta edición. Editorial Limusa Wiley. México, D.F.
- Day, T., L. Rowe. 2002. Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life-history transitions. *Am. Nat.* 159:338-350
- Denver, R. J.; Mirhadi, N.; Phillips, M. 1998. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: Response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology*, 79(6), 1859-1872.
- Doreste Guzmán, S. 2014. Dieta y caracterización de poblaciones de *Mannophryne cordilleriana* (Anura: Dendrobatidae) que habitan ambientes naturales y artificiales en la Sierra de Santo Domingo, Andes de Venezuela. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Downie, J. R.; Bryce, R.; Smith, J. 2004. Metamorphic duration: an under-studied variable in frog life histories. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(2), 261-272.
- Duellman, W. E. 1970. The Hyliid Frogs of Middle America. Volumen 1. Monograph of the Museum of Natural History, University of Kansas.
- Duellman, W. E.; Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. *JHU press*.
- Gervasi, S.S., Foufopoulos, J. 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Funct.Ecol.* 22: 100-108.
- Goater, C.P. 1994. Growth and survival of postmetamorphic toads: interactions among larval history, density and parasitism. *Ecology* 75: 2264-2274.
- Goater, C.P.; Semlitsch, R.D.; Bernasconi, M.V. 1993. Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. *Oikos* 66 129-136.
- Gosner, K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.

- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel W.E.; Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299: 1-262.
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4(1):9pp.
- Hernández, J. V. 2015. Reforzamiento poblacional y seguimiento de *Mannophryne vulcano* (Anura: Aromobatidae) en una microcuenca de montaña del estado Miranda, Venezuela. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Howard, R.D. (1988): Reproductive success in two species of anurans. In: *Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems*, p. 99- 113. Clutton-Brock, T.H., Ed., Chicago, University of Chicago Press.
- La Marca, E. 1994. Taxonomy of the frogs of the genus *Mannophryne* (Amphibia; Anura; Dendrobatidae). *Publicaciones de la Asociación de Amigos de Doñana*, Volumen 4. Sevilla, España.
- La Marca, E. 1995. Biological and systematic synopsis of a genus of frogs from northern mountains of South America (Anura: Dendrobatidae: *Mannophryne*). *Bull. Maryland Herp. Soc.*, 31:40-75. [June 1995].
- La Marca, E. 2005. Estatus de poblaciones de ranas de la familia Dendrobatidae (Amphibia: Anura) en sus localidades tipo en los Andes de Venezuela. *Herpetotropicos*, 2(2).
- La Marca, E. (Compilador). 2014. Anfibios en cautiverio: manual de procedimientos de uso interno del Centro de Conservación de Reptiles y Anfibios Andinos Venezolanos (CC-RAAV), Asociación Civil Biocontacto, Mérida, Venezuela. (No publicado).
- La Marca, E. 2015. Rescuing the endangered Merida's Collared Frog (*Mannophryne collaris*). *Amphibian Ark Newsletter* 31:2.
- La Marca, E. 2016. An ex-situ conservation program for the Merida's collared frog. *AArk Newsletter* 35:7.
- Limbaugh, B. A.; E. P. Volpe. 1957. Early development of the Gulf Coast toad, *Bufo valliceps* .Wiegmann. *Amer. Mus. Novitates* 1842:1-32.
- McCollum, S.A.; Leimberger, J.D. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* 109:615-621.
- Mijares-Urrutia, A. 1998. Los renacuajos de los anuros (Amphibia) altoandinos de Venezuela: morfología externa y claves. *Revista de Biología Tropical*, 46(1), 119-143.
- Miner, B.; Sultan, S.; Morgan, S.; Padilla D.; Relyea, R. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*. Vol. 20, no 12, p. 685-692.
- Molina C., Señaris J.C., Lampo M. y Rial A. 2009. Anfibios de Venezuela: estado del conocimiento y recomendaciones para su conservación. Ediciones grupo TEI. Venezuela.
- Morey, S.; Reznick, D. 2001. Effects of larval density on postmetamorphic spadefoot toads (*Spea hammondi*). *Ecology* 82: 510-522.
- Morey, S. R.; Reznick, D. N. 2004. The relationship between habitat permanence and larval development in California spadefoot toads: field and laboratory comparisons of developmental plasticity. *Oikos*, 104(1), 172-190.

- Newman, R. A. 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, 70(6), 1775-1787.
- Newman, R.A.; Dunham, A.E. 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia* 1994: 372-381.
- Ortiz, D.A., Almeida-Reinoso, D.; Coloma, L.A. 2013. Notes on husbandry, reproduction and development in the Pacific horned frog *Ceratophrys stolzmanni* (Anura: Ceratophryidae) with comments on its amplexus. *Int. Zoo Yearbook*. 47, 151–162.
- Poole, V.A.; Grow, S. 2012. Amphibian Husbandry Resource Guide, Edition 2.0. Association of Zoos and Aquariums, Silver Spring, MD.
- Reques, R.; Tejedo, M. 1997. Reaction norms for metamorphic traits in natterjack toads to larval density and pond duration. *J. Evol. Biol.* 10: 829-851.
- Richter, J.; Martin, L.; Beachy, C. 2009. Increased Larval Density Induces Accelerated Metamorphosis Independently of Growth Rate in the Frog *Rana sphenoccephala*. *Journal of Herpetology*, Vol. 43, No. 3, pp. 551–554, 2009.
- Richter-Boix, A.; Llorente, G.A.; Montori, A. 2006a. Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evol. Ecol. Res.* 8: 309-320.
- Richter-Boix, A., Tejedo, M. & Rezende, E.L. (2011). Evolution and plasticity of anuran larval development in response to desiccation. A comparative analysis. *Ecol. Evol.* 1, 15–25.
- Rugh, R. 1951. The Frog, Its Reproduction and Development. Blakiston Co. 1952. Experimental Embryology. Burgess Publ. Co.
- Sánchez, R. 2010. *Mannophryne cordilleriana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010 [En línea] [Consulta 14 de Octubre 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T55243A11279468.en>.
- Sánchez, D.; Chacón-Ortiz, A.; León, F.; Han, B. A.; Lampo, M. 2008. Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes. *Biological Conservation* 141: 2898 – 2905.
- Scott, D.E. (1994): The effect of larval density on adult demographic traits in *Ambystoma opacum*. *Ecology* 75: 1383-1396.
- Señaris J.C, Lampo M., Rojas-Runjaic F.J.M. y Barrio-Amorós C.L. 2014. Guía Ilustrada de los Anfibios del Parque Nacional Canaima, Venezuela. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela, 264pp.
- Shumway, W. 1940. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. I. External Form. *Anat. Rec.* 78:139-144.
- Smith, D.C. 1987. Adult recruitment in chorus frogs: Effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68: 344-350.
- Sultan, S.E.; Stearns, S.C. 2005. Environmentally contingent variation: phenotypic plasticity and norms of reaction. In *Variation: A Central Concept in Biology*. 2005, p. 303-332.
- Székely, P.; Tudor, M.; Cogălniceanu, D. 2010. Effect of habitat drying on the development of the Eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*) tadpoles. *Amphibia-Reptilia*, 31(3), 425-434.

Székely, D.; Denoël, M.; Székely, P.; Cogălniceanu, D. 2017. Pond drying cues and their effects on growth and metamorphosis in a fast developing amphibian. *Journal of Zoology*. 303(2), 129–135.

Taylor, A. C. and J. J. Kollros. 1946. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* 94:2-23.

Vial, J. L. 1973. Evolutionary biology of the anurans. In Symposium on Evolutionary Biology of the Anurans (1970: University of Missouri, Kansas City). University of Missouri Press.

Volpe, E. P. 1959. The larva of the oak toad, *Bufo quercicus* Holbrook. *Tulane Stud. Zool.* vol. 7. no. 4:145-152

Wilbur, H. M.; Collins, J. P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, 182(4119), 1305-1314.

Wilbur, H. M. 1987. Regulation of structure in complex systems: experimental temporary pond communities. *Ecology*, 68(5), 1437-1452.

Citas electrónicas

M. cordilleriana distribution map [En línea] [Consulta 14 de Octubre de 2017]. Disponible en: www.maps.iucnredlist.org/map.html?id=55243

Mannophryne cordilleriana. [En línea] [Consulta 2 de Marzo de 2018]. Disponible en: www.wikieva.org.ve/index.php/Mannophryne_cordilleriana

Major Treats [En línea] [Consulta 17 de Octubre de 2017]. Disponible en: www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/major-threats

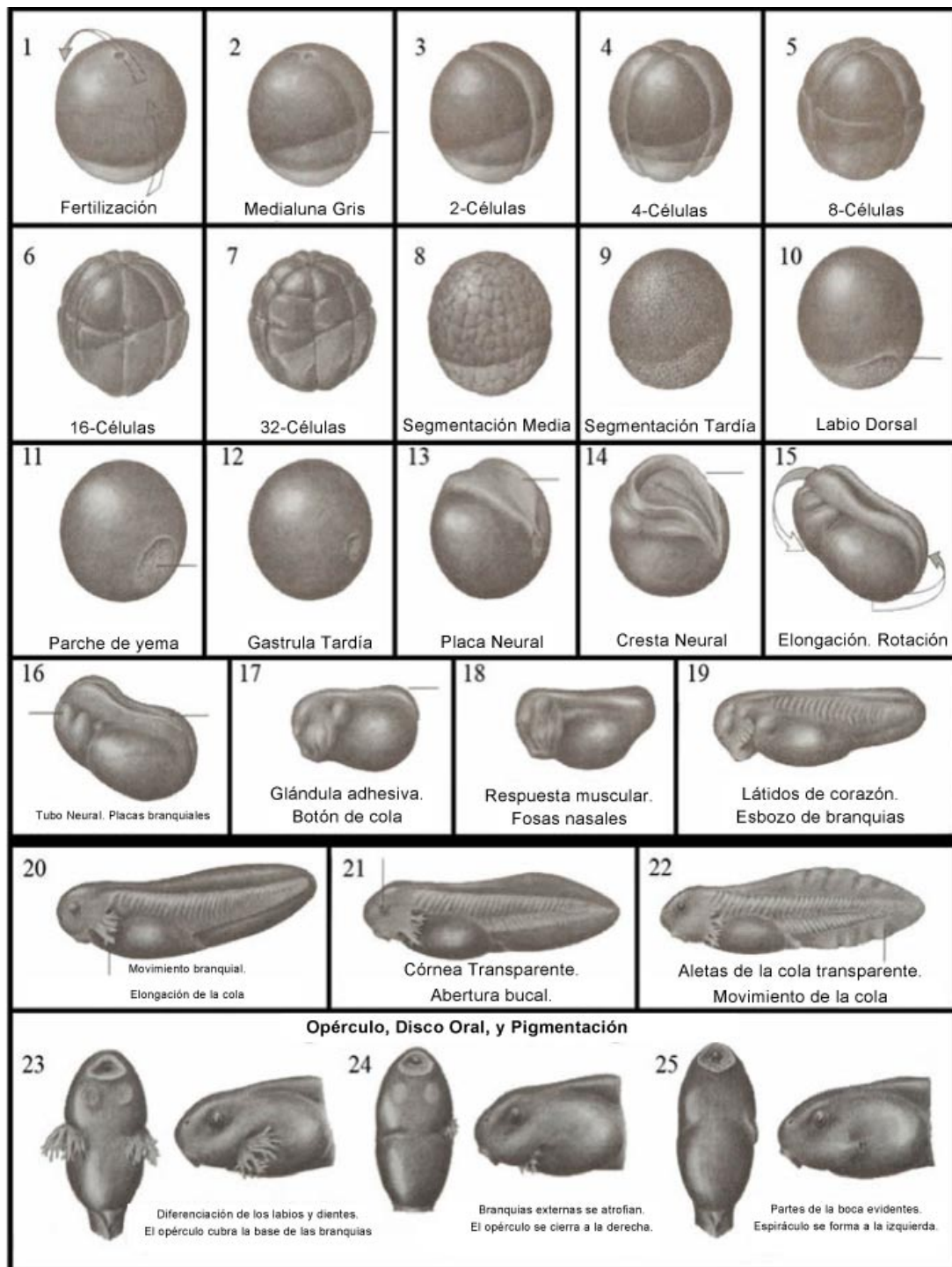
IUCN. 2004. Red List of Threatened Species. [En línea] [Consulta 24 de Abril de 2006]. Disponible en: www.iucnredlist.org.

IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-2. [En línea] [Consulta 11 de Noviembre de 2017]. Disponible en: www.iucnredlist.org.

Apéndice

Apéndice 1.a Tabla de estadios de Gosner (1960) por La Marca y Doreste (2014)

EMBRIÓN



ECLOSIÓN

Apéndice 1.b Continuación tabla de estadios de Gosner (1960) por La Marca y Doreste (2014).

LARVAS

