

**VARIACIÓN INTERPOBLACIONAL DE *ENGYSTOMOPS PUSTULOSUS* (COPE, 1864) (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EN TRES SUBREGIONES DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE (COLOMBIA).**



**VARIACIÓN INTERPOBLACIONAL DE *ENGYSTOMOPS PUSTULOSUS*  
(COPE, 1864) (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EN TRES SUBREGIONES DEL  
DEPARTAMENTO DE SUCRE (COLOMBIA).**

**PEDRO LUIS ATENCIA GÁNDARA**

**Trabajo de grado**

**Modalidad investigativa para obtener el título de biólogo**

**DIRECTORA:**

**LILIANA SOLANO FLOREZ**

**Dra. En Biología Evolutiva University of Manchester**

**CO-DIRECTOR:**

**JONATHAN LIRIA SALAZAR**

**Dr. En Entomología Universidad Central de Venezuela**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Dios, por su infinita misericordia, a mi familia por su apoyo incondicional y por ser mi motivo para superarme, a mis directores por su confianza y su asesoría constante, a mis amigos por alentarme a ser cada vez mejor, a La Universidad de Sucre y todo el cuerpo docente que contribuyó a mi formación académica. A las familias y nativos que me recibieron y me ayudaron durante mi fase de campo, en especial a la familia Martínez-Cogollo en la localidad de Santa Inés, quienes tienen mi absoluta estima por haberme acogido en el seno de su hogar.

A fin de que, arraigados y cimentados en amor  
seáis plenamente capaces de comprender con  
todos los santos cuál sea la anchura, la longitud,  
la profundidad y la altura.  
Epístola de San Pablo a los Efesios 3:17-18

**Resumen:** El distanciamiento de poblaciones, sumado a la heterogeneidad de hábitat, puede ser un detonante para que exista variación fenotípica en los organismos, como respuesta a las transformaciones y cambios en la dinámica de los ecosistemas, lo que incluye posibles ofertas diferenciales de algún recurso.

En este trabajo se evaluó la variación morfométrica intraespecífica y la dieta de *Engystomops pustulosus* en tres localidades del departamento de Sucre. Para esto se recolectaron de forma manual 30 individuos por localidad en búsquedas nocturnas. Se tomaron 10 medidas corporales y se evaluó mediante la técnica de morfometría geométrica la variación de la forma del cráneo a partir de una matriz con 15 landmarks. Se determinó la composición de la dieta y la importancia relativa de cada tipo de presa. Posteriormente se evaluó la relación entre la morfometría y las características de la dieta de esta especie.

Se encontraron diferencias significativas entre localidades respecto a nueve medidas morfométricas de los machos, solo el diámetro del ojo (DO) no mostró diferencias asociadas a la localidad. Las hembras presentaron diferencias significativas en todas las medidas. Solo en una localidad (Colosó, subregión Montes de María) hubo diferenciación significativa entre machos y hembras respecto al tamaño, justificado por seis medidas. Los análisis multivariados, permitieron discriminar y agrupar los individuos de las tres localidades.

El análisis morfogeométrico permitió evidenciar diferencias en talla (tamaño de centroide) y forma del cráneo entre localidades. No se encontraron diferencias significativas para el tamaño de centroide en relación con el sexo en las localidades, por otro lado, solo en una población (Colosó) hubo diferenciación significativa en la forma del cráneo respecto a esta variable.

Las termitas fueron el tipo de presa de mayor importancia en la dieta de *Engystomops pustulosus*, seguido de hormigas y ácaros. Los individuos provenientes de la localidad Santa Inés, mostraron mayor diversidad de presas en su dieta en comparación con el resto de localidades. Las características de la dieta no se correlacionaron con las variables morfométricas; sin embargo, el *Partial Least-Squares* indicó que existe correlación entre la composición de la dieta y la forma del cráneo.

La especie respondió al gradiente ambiental evaluado, la variación morfométrica reportada en este trabajo podría tener un valor adaptativo importante, al igual que la flexibilidad alimentaria.

Palabras claves: Morfometría, Cambios de forma, dieta, modificación de hábitat, rasgos de respuesta.

**Abstract:** Population isolation, coupled with habitat heterogeneity can be a driver for phenotypic variation in organisms, as they respond to changes in ecosystem dynamics, including potential the differential offer of some resources.

In this research the intraspecific morphometric variation and the diet of *Engystomops pustulosus* were evaluated in three locations in the department of Sucre. Thirty individuals per site were manually collected at night, ten body measurements were taken to each frog and the geometric morphometrics technique was used to assess the variation of the skull shape from a matrix of 15 landmarks. The composition of the diet and the relative importance of each type of prey were determined. The relationship between morphometry and dietary characteristics of this species was then evaluated.

Significant differences were found between localities with regard to nine morphometric measures of males, only the diameter of the eye (OD) exhibited no differences associated with the locality. Females presented significant differences in all measurements. Only in one locality (Colosó, subregion Montes de María) there was significant differentiation between males and females with respect to size, justified by six measures. The multivariate analysis allowed to discriminate and recover groupings of the individuals from the three localities.

The morphometric analysis showed differences in skull size (centroid size) and shape between localities. No significant differences were found for centroid size in relation to sex in localities, on the other hand, only in one population (Colosó) there was significant differentiation in the shape of the skull with respect to this variable.

The termites were the most important prey type in the diet of *Engystomops pustulosus*, followed by ants and mites. Individuals from the locality Santa Inés showed a greater diversity of prey in their diet compared to the rest of localities. Dietary characteristics were not correlated with morphometric variables; however, Partial Least-Squares indicated that there is a correlation between diet composition and skull shape.

The species responded to the environmental gradient evaluated; the morphometric variation as well as the food flexibility reported in this work could have an important adaptive value.

KeyWords: Morphometrics, shape changes, diet, habitat modification, response traits

## ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN. ....	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS. ....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo general .....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivos específicos .....	¡Error! Marcador no definido.

JUSTIFICACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
ANTECEDENTES: .....	¡Error! Marcador no definido.
MARCO CONCEPTUAL. ....	¡Error! Marcador no definido.
Especie estudiada.....	¡Error! Marcador no definido.
Variación morfológica.....	¡Error! Marcador no definido.
Morfometría lineal.....	¡Error! Marcador no definido.
Morfometría geométrica. ....	¡Error! Marcador no definido.
Landmarks o hitos: .....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis generalizado de Procrustes .....	¡Error! Marcador no definido.
Variables de conformación y Tamaño de centroide .....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis de los datos de la forma .....	¡Error! Marcador no definido.
METODOLOGÍA:.....	¡Error! Marcador no definido.
Sitios de muestreo.....	¡Error! Marcador no definido.
Trabajo en campo. ....	¡Error! Marcador no definido.
Trabajo en laboratorio .....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis estadísticos .....	¡Error! Marcador no definido.
RESULTADOS.....	¡Error! Marcador no definido.
Morfometría lineal:.....	¡Error! Marcador no definido.
Morfometría geométrica: .....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis de la dieta: .....	¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIONES:.....	¡Error! Marcador no definido.
CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
RECOMENDACIONES. ....	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOGRAFÍA: .....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS: .....	¡Error! Marcador no definido.
Anexos Metodológicos: .....	¡Error! Marcador no definido.
Anexos de resultado y discusión: .....	¡Error! Marcador no definido.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Aspecto de individuos de *E. pustulosus*, a la izquierda un individuo con tonalidad clara y a la derecha individuos en amplexus con tonalidad oscura. Fuente: Jorge Díaz. 22

**Figura 2.** Ajuste Procrustes aplicado a las configuraciones de tres cuadriláteros (A)

a través de rotación, (B) traslación y (C) escalado por medio de la superposición de los centroides. En (D), se muestra las configuraciones de los tres cuadriláteros superpuestos.

**Figura 3.** Tipos de deformaciones posibles sobre una grilla de deformación según Toro et al. (2004); los cambios uniformes mantienen el paralelismo de las líneas en la rejilla de deformación, mientras que en los cambios de tipo no uniforme, este paralelismo se interrumpe por cambios en la configuración de la rejilla.

**Figura 4.** Ubicación geográfica de las localidades de *Engystomops pustulosus* evaluadas en este estudio.

**Figura 5.** Medidas morfométricas usadas en este estudio, en la especie *Engystomops pustulosus*. B y C, Tomadas de Barreto et al., (2005) y modificado por el autor de este trabajo.

**Figura 6.** Gráfico de dispersión en torno a los dos primeros componentes principales del PCA basado en las diez medidas morfométricas tomadas de los individuos de la especie *E. pustulosus*.

**Figura 7.** Gráfico de dispersión en torno a las dos primeras variables canónicas basado en las diez medidas morfométricas tomadas de los individuos de la especie *E. pustulosus*, (elipse de confianza de 95%).

**Figura 8.** Variación de la longitud rostro cloaca (LRC) en adultos de *Engystomops pustulosus*. La barra central indica la media y la longitud de la caja representa la dispersión de los datos en torno a este valor.

**Figura 9.** Gráfico de dispersión en torno a los dos primeros componentes principales de la región dorsal del cráneo de los individuos de la especie *E. pustulosus*.

**Figura 10.** Análisis de variación canónica entre localidades, basado en la varianza de los componentes de la forma de la región dorsal del cráneo de *Engystomops pustulosus* (elipse de confianza de 95%).

**Figura 11.** Rejilla de deformación, en rojo se muestran los landmarks que aportan mayor varianza entre las configuraciones de morfocoordenadas del cráneo de los individuos de las tres localidades. Las diferencias de la forma son expresadas como deformaciones de una forma promedio en una rejilla deformable.

**Figura 12.** Grado de similaridad de las tres localidades en base a la dieta de *E. pustulosus*, según **A.** coeficiente de similitud de Jaccard **B.** Índice de Morisita-Horn.

**Figura 13.** Índices de importancia para las categorías de presa (IPS) consumidas por *E. pustulosus* en las tres localidades.

**Figura 14.** Principales géneros de hormigas encontrados en la dieta de los individuos de la localidad de Santa Inés.

**Figura 15.** Gráfico del PSL1 correspondiente al primer bloque (variables de la forma) versus el PSL1 del segundo bloque (variables tróficas), de los individuos de *E. pustulosus* de las tres localidades muestreadas (en base a una correlación de 64,1%).

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Landmarks usados en el análisis de morfometría geométrica y su posición sobre la región dorsal del cráneo.	32
<b>Tabla 2.</b> Variables morfométricas de machos de <i>E. pustulosus</i> (media $\pm$ desviación estándar) en las localidades evaluadas, la medida <b>DO</b> no mostró diferencias significativas (en negro *N/S) entre localidades.	35
<b>Tabla 3.</b> Variables morfométricas (media $\pm$ desviación estándar) en hembras de <i>E. pustulosus</i> por localidad.	35
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de reclasificación correcta obtenido a partir del CV/Manova de las medidas morfométricas y las matrices de morfocoordenadas de los individuos por localidad.	41
<b>Tabla 5.</b> Categorías de presa ingerida por individuos provenientes de la localidad de Santa Inés, Ni = número de individuos por categoría de presa, %N = porcentaje de composición numérica, F = frecuencia de aparición, %F = frecuencia de aparición porcentual, V = volumen de cada categoría, %V = volumen porcentual, IPS= índice de importancia de categoría de presa.	44
<b>Tabla 6.</b> Categorías de presa ingerida por individuos provenientes de la localidad de El Roble, Ni = número de individuos por categoría de presa, %N = porcentaje de composición numérica, F = frecuencia de aparición, %F = frecuencia de aparición porcentual, V = volumen de cada categoría, %V = volumen porcentual, IPS = índice de importancia de categoría de presa.	44
<b>Tabla 7.</b> Categorías de presa ingerida por individuos provenientes de la localidad de Colosó, Ni = número de individuos por categoría de presa, %N = porcentaje de composición numérica, F = frecuencia de aparición, %F = frecuencia de aparición porcentual, V = volumen de cada categoría, %V = volumen porcentual, IPS = índice de importancia de categoría de presa.	45
<b>Tabla 8.</b> Valores promedio de longitud, ancho y volumen de las presas ingeridas por los individuos de las tres localidades evaluadas.	46
<b>Tabla 9.</b> Resultados del análisis de mínimos cuadrados parciales que evalúa la covariación de los componentes de la forma del cráneo de los individuos y la composición de la dieta de <i>E. pustulosus</i> .	47

## ÍNDICE DE ANEXO

<b>Anexo 1.</b> Protocolo de campo usado durante las jornadas de muestreo en cada una de las localidades.	68
---	----

<b>Anexo 2.</b> Fotografía de los hábitats predominantes en los sitios de muestreo <b>A.</b> Montes de María localidad de Colosó, bosque seco tropical <b>B.</b> Municipio de El Roble área abierta y pastizal inundable <b>C.</b> Cuerpo de agua (jagüey) en finca de la localidad de Santa Inés.	69
<b>Anexo 3.</b> Autor de este trabajo durante la obtención de datos primarios para el análisis con morfometría geométrica y de dieta de la especie.	70
<b>Anexo 4.</b> Posición anatómica de los landmarks sobre la región dorsal del cráneo de los especímenes.	71
<b>Anexo 5.</b> Estadísticas descriptivas en base a las medidas morfométricas tomas en individuos machos y hembras de las tres localidades, se muestra la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos.	71
<b>Anexo 6.</b> Resultados de la prueba t-student realizada entre machos y hembras por localidad, se muestran los valores de t y su respectiva significancia estadística. Con negrita se resaltan valores $p < 0,05$ .	73
<b>Anexo 7.</b> Resultados del ANOVA realizado entre individuos de las tres localidades, separados según el sexo; se muestran los valores de la suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrados medios, F y su respectiva significancia estadística.	73
<b>Anexo 8.</b> Coeficientes de determinación $R^2$ calculado de la correlación entre la variable de tamaño LRC y el resto de las medidas morfométricas, para los individuos de cada localidad, en negro se muestran las correlaciones que arrojaron valores de p mayores a 0.05, es decir no significativos.	74
<b>Anexo 9.</b> Varianza explicada por cada uno de los componentes principales, del PCA realizado en base a las medidas morfométricas tomadas en individuos de cada localidad.	74
<b>Anexo 10.</b> Aportes de varianza a los componentes principales en cada una de las diez medidas morfométricas tomadas en los individuos de las tres localidades.	74
<b>Anexo 11.</b> Porcentajes de reclasificación correcta, resultante del CVA/Manova en base a la matriz de covarianza de las 10 medidas morfométricas tomadas en individuos de las tres localidades.	75
<b>Anexo 12.</b> Análisis generalizado de Procrustes en base a las matrices de morfocoordenadas de los individuos de las tres localidades, La dispersión en torno a cada landmark representa la variación de forma, realizado en el software MorphoJ.	75
<b>Anexo 13.</b> Varianza explicada por cada uno de los componentes dimensionales extraídos del análisis de componentes principales, de la forma del cráneo de los individuos de cada localidad.	76
<b>Anexo 14.</b> Formas promedio del cráneo de <i>Engystomops pustulosus</i> , reconstruidas a partir de las configuraciones de los individuos de <b>A.</b> Colosó, <b>B.</b> El Roble y <b>C.</b> Santa Inés, <b>D.</b> Representa una forma consenso.	77
<b>Anexo 15.</b> Porcentajes de reclasificación correcta, resultante del CVA/Manova de las conformaciones de morfocoordenadas del cráneo (en negrita).	78
<b>Anexo 16.</b> Numero de presas por categoría, encontradas en los estómagos de individuos de las tres localidades (N=90).	79
<b>Anexo 17.</b> Coeficientes de determinación $R^2$ producto de la regresión lineal entre	

las variables morfométricas de la especie *E. pustulosus* y las características de las presas ingeridas, en negrita las correlaciones que tuvieron valores de  $p$  menores a 0,05. 79

**Anexo 18.** Comparación de las variables tróficas en relación con el sexo, en cada localidad. Resultados de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y media, en negrilla se indican valores de  $p < 0,05$ . Variables tróficas, V. Cont. Est.: volumen del contenido estomacal; N. Ítems: Número de ítems; longitud, ancho y volumen de presa. 79

## INTRODUCCIÓN.

El impacto de la modificación del hábitat afecta negativamente a muchas especies de anfibios, que por sus características fisiológicas y su biología dependiente del agua, se consideran como organismos vulnerables ante cambios en las condiciones ambientales (Stuart *et al.*, 2004). El nivel de respuesta de los anfibios a las alteraciones del medio, depende de sus rasgos funcionales, de la historia de vida de las especies y en últimas de la capacidad adaptativa (Vitt y Caldwell 2014; Cortés *et al.*, 2015). La heterogeneidad de los entornos naturales posibilita la diferenciación de individuos y el desarrollo de nuevos rasgos o variantes de los ya existentes en respuesta al cambio, esto puede ocurrir a nivel intra e interpoblacional (Silva *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008; Marín, 2010; Baraquet *et al.*, 2012).

A nivel intraespecífico la variación geográfica de caracteres morfométricos en anfibios está bien documentada, (Vieira *et al.*, 2008; Amor *et al.*, 2009; Bidau *et al.*, 2011; Zaragoza, 2013; Baraquet *et al.* 2012), este enfoque se ha evaluado en gradientes altitudinales (Campo, 1995) y latitudinales (Iturra-Cid *et al.*, 2010; Armijos-Ojeda, 2012), así mismo entre diferente biozonas en donde variables ambientales como la temperatura, humedad y radiación anual se consideran las principales factores que generan diferenciación (Zaragoza, 2013; Baraquet *et al.* 2012).

La variación intraespecífica puede obedecer a dos factores causales, el primero implica adaptación local, que se da cuando ocurre diferenciación genética entre poblaciones como consecuencia del aislamiento geográfico y los organismos se desarrollan bajo diferentes presiones de selección; el segundo factor es la plasticidad fenotípica, que hace referencia a la capacidad intrínseca que poseen los individuos al poder expresar diferentes fenotipos a partir de un mismo genotipo en respuesta a la heterogeneidad ambiental (la norma de reacción) (Salgado y Paz, 2015). La plasticidad fenotípica se da como resultado de la interrelación de factores genéticos y ambientales y obedece en la mayoría de los casos a una forma de respuesta de los individuos a los cambios en su hábitat, es muy común que muchas especies expresen algún tipo de variación morfológica fisiológica o conductual; la trascendencia de esta variante en las poblaciones la determina la funcionalidad de los diferentes rasgos de respuesta (Vieira *et al.*, 2008; Baraquet *et al.*, 2012).

El tamaño corporal y los rasgos de historia de vida son cruciales para la supervivencia de los organismos de una especie, pues por un lado las dimensiones corporales se relacionan con el uso de recursos, rendimiento locomotor y la relación depredador-presa (Atkinson, 1994; Smith y Van Buskirk, 1995), mientras que los rasgos de historia de vida definen el *fitness* de los individuos y las variaciones en estos se asocia con fluctuaciones en la disponibilidad de algún recurso (Vitt y

Caldwell 2014; Cortés *et al.*, 2015).

En la región Caribe colombiana se ha reportado alarmantes tasas de transformación de los ecosistemas naturales, allí se incluye la bien documentada disminución de la extensión original del bosque seco tropical, que se calcula en la actualidad a tan solo un 8% (Pizano y García, 2014; Carvajal-Cogollo, 2014). El predominio de grandes coberturas de paisajes rurales en las tierras bajas del Caribe colombiano, especialmente en el departamento de Sucre, donde estos se caracterizan por incluir matorrales, áreas de pastizales, pequeños relictos de bosque, cultivos y áreas urbanas, ha despertado gran preocupación en torno a la fauna que ahí coexiste (Carvajal-Cogollo, 2014; Bernal-González, 2014).

Ya se ha dicho que la transformación de los ecosistemas, se da en detrimento de la diversidad biológica y afecta los balances ecológicos y funcionales esenciales para los organismos (Cushman, 2006; Bernal-González, 2014).

La fauna anfibia en las bajas altitudes del Caribe colombiano es muy homogénea y se caracteriza por presentar gran número de especie generalistas en la explotación de recursos como tiempo de actividad, dieta y microhábitat (Romero y Lynch, 2012; Acosta-Galvis, 2012; Bernal-González, 2014). Sin embargo, las restricciones ecofisiológicas de este grupo de vertebrados y su poca vagilidad, los hacen muy vulnerables a los cambios en el ambiente, por lo cual es factible pensar que la conversión masiva de áreas boscosas en agroecosistemas, puede estar generando presiones ambientales importantes en las poblaciones de anfibios en esta región del país. Los efectos de la transformación del hábitat pueden expresarse como respuestas diferenciales de los organismos en poblaciones dentro de un gradiente de transformación, en el cual puede haber distintos grados de estructuración vegetal y usos del suelo (Flynn *et al.* 2009; Urbina-Cardona y Reynoso 2005; Corral-Gómez, 2013). Estos efectos desde luego serían medibles a través de los rasgos de respuesta en distintas poblaciones de una especie. En este sentido y bajo esta premisa se planteó estudiar la variación en los rasgos morfométricos y de historia de vida (dieta), en la especie *E. pustulosus* en tres localidades del departamento de Sucre, que muestran diferencias en la estructura vegetal, en el grado de alteración pasada y presente y en las condiciones fisiogeográficas (Aguilera, 2005).

La morfometría geométrica (Bookstein 1991, Rohlf & Marcus 1993, Adams *et al.* 2004, Zelditch *et al.* 2004), ha sido utilizada con éxito para evaluar diferencias intraespecíficas en especies de anfibios (Birch, 1999; Larson, 2002; Vieira *et al.*, 2008; Ponssa y Vera, 2012), ésta técnica se soporta sobre análisis estadísticos multivariados (Toro *et al.*, 2010), que permiten evaluar la variación de las formas biológicas, permitiendo conservar sus características geométricas intrínsecas. La MG ha mostrado ser muy útil en el estudio de aspectos ecomorfológicos en especies

de anfibios (Kaliontzopoulou, 2011), en este sentido se han introducido nuevos enfoques en el análisis de la correlación de la forma y variables ecológicas, como la dieta (Adams y Rohlf, 2000).

*Engystomops pustulosus* es una especie de rana de la familia Leptodactylidae, que se distribuyen desde el este y sureste de México hasta el norte de Suramérica (Cuentas *et al.*, 2002); en Colombia tiene ocurrencia en las regiones Andina, Orinoquia, Caribe y Pacífico entre los 0-1400 m de altitud (Acosta-Galvis, 2012; Romero y Lynch, 2012). Es muy común en todo el departamento de Sucre y muestra ocurrencia en diferentes tipos de hábitats (Blanco-Torres, 2009; Acosta-Galvis, 2012). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la variación morfométrica y la dieta de *E. pustulosus* en tres localidades del departamento de Sucre, haciendo uso de las técnicas de morfometría tradicional y morfometría geométrica.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general**

Determinar la variación morfométrica y la dieta de la especie *Engystomops pustulosus* en tres localidades del departamento de Sucre.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar la variación morfométrica en tres poblaciones de la especie *Engystomops pustulosus* en el departamento de Sucre, por medio de medidas morfométricas y morfometría geométrica.
- Analizar la dieta de la especie y evaluar su posible relación con los aspectos morfométricos individuales.
- Determinar la covariación entre las variables de la forma y la composición de la dieta en *E. pustulosus*.

## **JUSTIFICACIÓN.**

En Colombia el bosque seco tropical y las sabanas antropizadas, propias de algunas zonas del Caribe cuentan con una baja riqueza de especies de anfibios, en comparación con otras zonas del país; así mismo, el bajo endemismo que se

presenta en la región Caribe, se ha explicado por las condiciones ambientales de baja humedad y alta radiación (Lynch *et al.*, 1997; Aguilera, 2005). Los ensamblajes de especies de anuros de tierras bajas del Caribe colombiano, habitan ecosistemas fuertemente alterados por la acción antrópica (Acosta-Galvis, 2012). Estos organismos se encuentran a expensas de la disponibilidad de recursos hídricos, debido a sus características fisiológicas y su compleja reproducción, dependiente de agua (Duellman y Trueb, 1994). El departamento de Sucre cuenta con cerca de 26 especies de anfibios reportadas; dentro de las cuales, la subfamilia Leiuperinae está representada por tres especies: *Engystomops pustulosus*, *Pleurodema brachyops* y *Pseudopaludicola pusilla* (Acosta-Galvis, 2012). Las especies de esta subfamilia tienen ocurrencia en la mayor parte del departamento y se cree que son especies comunes, bien establecidas, con una gran tolerancia al clima seco y que además muestran un uso similar de recursos, por ende deberían estar sometidas a las mismas presiones ambientales (Blanco-Torres *et al.*, 2009).

El departamento de Sucre se ha dividido en cinco subregiones fisiográficas (Montes de María, Golfo de Morrosquillo, Sabanas, San Jorge y Mojana); los ecosistemas presentes en cada zona y sus condiciones ambientales se consideran relativamente diferentes y, además, se pueden ubicar en un gradiente de perturbación antrópica (Aguilera, 2005), de zonas más alteradas como las que corresponden a la subregión Sabanas, hasta las más conservadas como las de la subregión Montes de María. A lo largo de sus extensiones se registran algunas diferencias en torno a la vegetación y los regímenes hidrológicos, estas características desde luego puede condicionar la existencia de distintos microclimas y microhábitats en esta zona del país y ser el detonante para que los individuos desarrollen adaptaciones, correlacionadas con elementos de los ambientes en que habitan, así mismo para el surgimiento de variaciones fenotípicas y genotípicas, producidas por factores como el aislamiento geográfico, el grado de transformación del suelo, la vegetación y debido a diferencias en la disponibilidad de recursos (Ernst y Rodel, 2005; Blanco-Torres *et al.*, 2009).

Se podría pensar que los anfibios son propensos a mostrar altos niveles de variabilidad morfológica y genética debido al aislamiento geográfico en que se encuentren sus poblaciones, si se tiene en cuenta la poca capacidad de dispersión de estos organismos, que en su mayoría están fuertemente asociados a cuerpos de agua y zonas húmedas (Driscoll, 1998; Duellman y Trueb, 1994). Saber de qué manera se dan las variaciones genéticas y morfológicas en poblaciones de una misma especie es importante para comprender sus procesos adaptativos y ecológicos (Pröhl *et al.*, 2010), ya que el grado de variación genotípica o fenotípica de un organismo dentro de una población define aspectos importantes de su biología, ecología y garantiza en términos generales su eficacia biológica

(Tryjanowski *et al.*, 2006). Por otra parte, una alta variación genotípica y fenotípica en poblaciones alopátricas que estén bajo condiciones diferentes, puede derivar en procesos de diferenciación de subgrupos de una misma especie (Amor *et al.*, 2011).

En este sentido, el presente trabajo contribuirá a mejorar nuestro conocimiento sobre la ecología y la variación morfométrica entre poblaciones de la especie *Engystomops pustulosus*; también ayudará a comprender cómo se diferencian los individuos distribuidos en tres subregiones del departamento de Sucre; se estudiará la diferenciación morfométrica y la dieta, como rasgos de respuesta en poblaciones de *E. pustulosus*, que son temas que aún no se han trabajado en este grupo taxonómico en el departamento, pues la mayoría de los trabajos realizados anteriormente, tienen un enfoque meramente taxonómico y fueron realizados con el objetivos de generar listados de especies (Acosta-Galvis, 2012; Romero y Lynch, 2012; Galván-Guevara *et al.*, 2009).

Lo que motivó el planteamiento de este estudio fue en primera instancia la necesidad de evaluar la posible variación entre poblaciones de la especie estudiada en el departamento y tratar de entender cómo se dan tales eventos de diferenciación. La información resultante puede ayudar a evaluar los efectos que podría tener la destrucción del hábitat sobre esta especie de anfibio, así mismo contribuirá a entender como ocurren algunos procesos adaptativos en este grupo, lo cual es importante en un escenario de cambio global. La ausencia de trabajos que aborden estos tópicos de la ecología de las poblaciones de anuros en Colombia fue algo que también orientó esta investigación hacia el estudio del fenómeno de la variación interpoblacional.

## **ANTECEDENTES:**

Las variaciones fenotípicas y genotípicas ocurren con frecuencia en poblaciones de especies que se encuentren separadas geográficamente y que ocurren en hábitats diferentes, cada uno con condiciones propias de temperatura, luminosidad, humedad y de recursos disponibles; como consecuencia, la interrupción de flujo genético, la acumulación de micromutaciones o la deriva genética podrían coadyuvar a estos eventos de diferenciación de las poblaciones en el ambiente natural (Silva *et al.*, 2008; Ashton, 2002). La heterogeneidad de los entornos naturales posibilita la diferenciación de individuos y el desarrollo de la plasticidad fenotípica de los mismos, en respuesta al cambio; en ese sentido todos los individuos poseen una norma de reacción producto de la interrelación de factores genéticos y ambientales, que derivan en un fenotipo con viabilidad en un ambiente dado (Amor *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2008).

Variación morfológica: Las variaciones más comunes están relacionadas con el tamaño corporal y la pigmentación, aunque estudios recientes han mostrado que también ocurre un tipo de flexibilidad digestiva que con frecuencia expresan algunos mamíferos pequeños y ectotermos como lo anfibios (Baraquet *et al.*, 2012; Marín, 2010; Naya *et al.*, 2008; Naya y Bozinovic, 2004; Vences *et al.*, 2002).

La variación fenotípica como efecto de diferenciación adaptativa ha sido estudiada en muchos grupos de endotermos y ectotermos, para los cuales se ha documentado que existe tal variación tanto a nivel intraespecífico como interespecífico; autores han asociado estos eventos con variaciones ambientales y genéticas, además se considera la disponibilidad de alimento como un factor importante en ciertos grupos (Ashton *et al.*, 2000; Amor *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2008; Ashton y Feldman, 2003; Baraquet *et al.*, 2012).

En anfibios los estudios de variación morfológica intraespecífica en poblaciones separadas geográficamente han revelado gran variación en el tamaño corporal y características alométricas propias en ciertas especies (Zaragoza, 2013; Amor *et al.*, 2011; Cvetkovic *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008), un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Baraquet *et al.* (2012), en ranas de la especie *Hypsiboas cordobae*, donde con el uso de 15 medidas morfométricas pudieron demostrar la variación morfológica que presentan estas especies en seis poblaciones de las provincias de Córdoba y San Luis, Argentina; Marín (2010) por su parte encontró resultado similares en ranas de la misma familia (Hylidae) reportando alta variabilidad morfométrica entre poblaciones.

Técnicas para el estudio de la variación morfológica: El estudio de la variación morfológica hace uso de las técnicas morfométricas comunes y las más especializadas, permitiendo determinar a partir de las dimensiones y de la forma cuantificada, la variación propiamente dicha y con un sentido biológico (Toro *et al.*, 2010; López, 2015; Cazorla y Acosta, 2003); en la actualidad existen dos enfoques en los estudio morfométricos: el de la morfometría lineal o tradicional y el de la morfometría geométrica.

Morfometría tradicional: Este tipo de morfometría aborda los organismos mediante el uso de medidas lineales, como largo total (LT) o ancho de la cabeza (AC), que son medidas que aportan, desde luego, valiosa información sobre los organismos estudiados en términos de sus unidimensionalidades, con la ayuda de las herramientas estadísticas univariadas y multivariadas (Marcus, 1990).

Ha sido documentado el uso de esta técnica en diferentes enfoques al momento de estudiar la diversidad de organismos vivos, desde estudios taxonómicos hasta ecológicos, un ejemplo de esto es el trabajo de Amor *et al.* (2011), en el cual se evaluó la variación morfológica del sapo verde africano *Bufo boulengeri*, aplicando morfometría tradicional con 10 medidas morfométricas, combinada con análisis

multivariados y univariados, los autores encontraron diferencias significativas para el tamaño corporal entre poblaciones de las regiones estudiadas, estas diferencias fueron asociadas a un alto grado de plasticidad fenotípica en la especie y a factores ambientales locales, dado que el tamaño aumenta de norte a sur. La morfometría tradicional combinada con análisis multivariados resulta ser una técnica potente al momento de estudiar la variación intraespecífica en poblaciones naturales (Baraquet *et al.*, 2012; Marin, 2010; Silva *et al.*, 2008).

Morfometría geométrica: Importantes avances se han logrado con la integración de herramientas computacionales para análisis, no solo de morfometría tradicional, sino también en el estudio de la forma pura basado en coordenadas cartesianas lo que se conoce como Morfometría Geométrica (MG), en esta técnica se usan landmarks o puntos anatómicos de referencia (PAR) para reconstruir la forma de los individuos estudiados y reflejar la variación que estos presentan en términos cuantitativos (Vieira *et al.*, 2008; Calle *et al.*, 2008; Klingenberg, 2013). El análisis generalizado de Procrustes es la metodología que fundamenta la técnica y esta a su vez tiene de base teórica la definición de forma establecida por David Kendall (1977) "Forma es toda la información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación de un objeto", esta delimitación teórica es en resumen lo que se logra al aplicar una transformación de Procrustes a los datos morfogeométricos, que es extraer aquellos componentes que no define la forma (Toro *et al.*, 2010).

La morfometría geométrica revela la variación que hay entre los organismos, conservando su sentido biológico y permitiendo visualizar cada uno de los cambios de la forma; estas ventajas permite superar las limitaciones de la morfometría tradicional (Toro *et al.*, 2010). Recientes estudios han mostrado como la nueva tendencia de la morfometría geométrica resulta más efectiva en los análisis morfológicos respecto a la técnica basada en medidas lineales. Un ejemplo de esto es el estudio de Moreno *et al.* (2013) donde aplicaron ambas técnicas para estudiar la variación morfométrica de seis subespecies de la lagartija *Phrynosoma orbiculares* y encontraron que la morfometría tradicional no permitió definir las subespecies en grupos distintos, mientras que con la morfometría geométrica pudieron diferenciar tres de estas subespecies en base a diferencias en la forma de estructuras anatómicas. De igual manera Zaragoza (2013) no pudo delimitar claramente especies de tritones del género *Calotriton* usando solo medidas morfométricas. Hoyos *et al.* (2003) estudiaron la posible divergencia morfométrica entre *Bothrops axrox* y *Bothrops asper* con la técnica tradicional, pero debido a que las medidas morfométricas tomadas no parecían tener sentido biológico recomendaron hacer estudios con morfometría geométrica para poder determinar la variación entre estas especies. En muchos organismos modelos y también en diversos enfoques el uso

de morfometría geométrica ha justificado la variación a nivel intra e interespecífico, ejemplo de ello son los trabajos de: Gamboa y Arrivillaga (2010) en un análisis morfométrico de cuatro especies simpátricas de Plecópteros; Moreno-Fonseca y Amat-García (2016) en un estudio de morfoecología de gremios en escarabajos pasálidos; Pedraza y Campos (2007) en el estudio sobre la variación morfológica del gonópodo del cangrejo *Stregeriana maniformis*; García *et al.* (2011) en su estudio morfológico de peces Characiformes; Bechara y Liria (2012) delimitaron taxonómicamente cuatro especies de Buthidae y una de Scorpionidae; Cazorla y Acosta (2003) caracterizaron especies de *Lutzomyia* con el uso de esta técnica.

Los estudios en especies de anfibios a pesar de ser pocos muestran gran resolución con el uso de la técnica morfogeométrica; en estudios ontogénicos Ponssa y Vera (2012) estudiaron los patrones de desarrollo del cráneo en ranas de la familia Leptodactylidae, encontrando con esta técnica un alto grado de variación alométrica debida al crecimiento; Larson (2002) aplicó morfometría lineal y geométrica para estudiar los cambios que presenta el condrocráneo durante el desarrollo larvario de *Rana sylvatica*. La morfometría geométrica permitió en ambos casos visualizar los cambios de la forma de las estructuras de individuos metamórficos. En anuros posmetamórficos es incipiente la información documentada sobre el uso de la técnica; se destaca el trabajo de Vieira *et al.* (2008), quienes estudiaron la variación intraespecífica en una población del sapo neotropical *Proceratophrys cristiceps* aplicando morfometría tradicional y geométrica; los autores pudieron comprobar la existencia de dos morfotipos simpátricos de la especie que se soportan en diferencias encontradas en la forma del cráneo y en el patrón de coloración. Ivanovic *et al.* (2011) evalúan las relaciones filogenéticas entre subespecies del tritón *Lissotriton vulgaris*, analizan datos moleculares, además de la variación del tamaño y la forma del cráneo de los individuos, con lo que sustentan las diferencias entre dos subespecies. Birch (1999) estudia la variación intraespecífica en *Bufo marinus* (= *Rhinella marina*), aportando datos sobre la variación alométrica en el cráneo de esta especie. Dayton *et al.* (2005) estudió la relación entre la forma del cuerpo en larvas de anuros y la capacidad que estos tenían para responder ante depredadores, este estudio sugiere que colas más anchas y cuerpos pequeños optimizan la capacidad de respuesta de las larvas frente a los depredadores.

Otros estudios muestran como la morfometría geométrica ha permitido relacionar características biomecánicas y morfométricas con aspectos de la dieta en poblaciones simpátricas y alopátricas de dos especies de salamandras (Adams y Rohlf, 2000). Para el caso de estudios taxonómicos, recientemente Acevedo *et al.* (2016) reevaluaron el estatus taxonómico de *Rhinella marina*, con técnicas moleculares analizando dos genes mitocondriales y con morfometría geométrica usando 23 landmarks para reconstruir la forma del cráneo de especímenes de

diferentes poblaciones del este y el oeste de la cordillera de los Andes; los autores encontraron diferencias significativas entre dos grupos geográficos de la especie, a nivel genético y morfométrico, reflejando la variación morfológica y diferenciación genética que presentan los individuos de las poblaciones del este y el oeste, y con base en ello soportaron la existencia de dos morfotipos de la especie dentro del complejo taxonómico *Rhinella marina*, antes mencionado por otros autores (Slade y Moritz 1998, Vallinoto *et al.* 2010; Sequeira *et al.* 2011).

La morfometría geométrica es una potente herramienta para estudios ecológicos, taxonómicos y ontogénicos, porque permite evidenciar la variación propiamente dicha, asociada a las variables y dimensiones biológicas de la especie (Davis *et al.*, 2016); además, es importante para comprender la interacción entre el fenotipo, el genotipo y el ambiente, principalmente en poblaciones de anfibios (Vieira *et al.*, 2008).

Estudios con la especie:

En Colombia la subfamilia Leiuperinae cuenta con tres representantes para la región Caribe *Pleurodema brachyops*, *Pseudopaludicola pusilla* y *Engystomops pustulosus*, esta última es una especie neotropical, conocida comúnmente como sapito túngara, debido al sonido característico de sus vocalizaciones, es habitante de zonas con baja altitud y es capaz de reproducirse en cuerpos de agua temporales donde construye nidos de espuma que garantizan el desarrollo y supervivencia de huevos y renacuajos (Ryan, 1985; Acosta-Galvis, 2012); su rango de distribución abarca gran parte de Centroamérica hasta el norte de Suramérica, en Colombia se encuentra presente en las regiones Andina, Orinoquia, Caribe y Pacífico entre los 0-1400 m de altitud (Acosta-Galvis, 2012; Romero y Lynch, 2012).

*Engystomops pustulosus* ha sido un buen modelo de estudio de la selección sexual y la comunicación en anfibios, pues se han desarrollado algunas investigaciones de conducta, variación y ecología entorno a las vocalizaciones que realizan los machos de esta especie como mecanismo para atraer pareja o como canto de advertencia entre los individuos de una población, la mayoría de estos trabajos han sido adelantados en zonas de distribución de la especie entre Panamá y Costa Rica (Green, 1990; Ryan *et al.*, 1996, Ryan, 1998). A lo largo de toda esta región se ha documentado además el estado de las poblaciones y la diversidad genética de *E. pustulosus* y debido a esto se conocen algunos aspectos de la genética de poblaciones de la especie a mayor y menor escala (Lampert *et al.*, 2003; Pröhl *et al.*, 2010).

Los avances en la utilización de marcadores moleculares informativos, alozimas y segmentos de genes mitocondriales ha permitido dilucidar una parte de la historia

evolutiva de esta especie en su actual rango de distribución, estudios confirman la existencia de dos linajes alopátricos divergentes, uno hacia el norte y otro al sur en la vertiente del centro de Costa Rica (Pröhl *et al.*, 2010). A pesar de esto no se tiene información documentada sobre los procesos adaptativos de la especie en hábitats diferentes, ni sobre el efecto que puede tener la transformación del suelo y la vegetación en la diversidad y estructura genética de las poblaciones, de igual forma el poco conocimiento existente sobre caracteres funcionales de respuesta al ambiente en la especie son muy incompletos, únicamente Cannatella y Duellman (1984) en una revisión del complejo de especies del grupo *Physalaemus pustulosus*, abordan algunos aspectos de la variación morfológica de la especie en 9 localidades a lo largo de su rango de distribución; los autores reportan diferencias en los patrones de coloración dorsal y ventral, así como en el patrón de pústulas de la región dorsal, además en dicho trabajo sólo evaluaron la variación interpoblacional para la medida morfométrica longitud rostro-cloaca (LRC), en la cual encontraron diferencias significativas que no pudieron ser asumidas como variación clinal. En adición, Nascimento *et al.* (2005), también en una revisión de las especies del género *Physalaemus*, reportaron, dimorfismo sexual en la especie para las medidas morfométricas, longitud rostro cloaca (LRC) y el ancho (AC).

Algunos aspectos de la dieta de la especie ya han sido evaluados en anteriores trabajos (Viña, 2015; Blanco-Torres, 2009; González-Durán *et al.*, 2012), pero no se conoce si los recursos son explotados diferencialmente a nivel espacial o temporal, ni se ha mencionado algún papel adaptativo de la dieta en ambientes diferentes. Se ha planteado que las características de la dieta en anuros están muy relacionadas con el tamaño corporal y la forma de la cabeza (Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007; Biavati *et al.*, 2004), esto ha sido entendido como un mecanismo que flexibiliza la competencia intraespecífica y reduce el solapamiento de nicho trófico con especies sintópicas, debido a que las especies o individuos de diferente talla explotan recursos distintos en el mismo hábitat (Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007; Blanco-Torres, 2009). Esto es muy importante a nivel ecológico debido a que el uso y repartición de los recursos alimentarios, determina la estructura de los ensamblajes de anuros (Toft, 1980, 1985; Miyamoto, 1982; Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007; Blanco-Torres, 2009); así la disponibilidad de este recurso a nivel local puede definir los grados de competencia entre individuos coexistentes; en tal caso, la plasticidad alimentaria y las estrategias generalistas contribuirán a mantener un equilibrio en los dos dominios tróficos posibles depredador-presa y depredador común-competidor oportunista (Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007).

## MARCO CONCEPTUAL.

### Especie estudiada

El sapo túngara *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864), pertenece a la familia Leptodactylidae, subfamilia Leiuperinae y al género *Engystomops*, esta última categoría taxonómica fue revalidada en la revisión del género *Physalaemus* hecha por Nascimento *et al.* (2005). Filogenéticamente el género *Engystomops* se encuentra dividido en dos clados hermanos bien definidos: Duovox y Edentulus. *Engystomops pustulosus* pertenece al clado Edentulus, caracterizado por la ausencia de dientes vomerinos, junto a *E. freibergi* y *E. petersi*, mientras que en el grupo Duovox, que presenta dientes, se encuentran incluidas las especies *E. pustulatus*, *E. puyango*, *E. guayaco*, *E. coloradorum*, *E. montubo* y *E. randi* (Ron *et al.*, 2006).

*Engystomops pustulosus* está distribuida desde el este y sureste de México hasta el norte de Suramérica (Cuentas *et al.*, 2002), en Colombia tiene ocurrencia en las regiones Andina, Orinoquia, Caribe y Pacífico entre los 0-1400 m de altitud (Acosta-Galvis, 2012; Romero y Lynch, 2012).

Los individuos de esta especie son ranas de pequeño tamaño que se caracterizan por tener la textura de su piel y la membrana timpánica tuberculada, glándulas parótidas, tubérculo tarsal y por carecer de dientes vomerinos; la superficie de su dorso toma coloraciones entre marrón y marrón oscuro (Figura 3), consta además de diferentes patrones formados por pequeños tubérculos y manchas irregulares (Cannatella y Duellman, 1984). Es una especie común en tierras bajas, que habita charcas temporales, pastizales y la hojarasca en bosques secos, no presenta una estacionalidad marcada pero sus tendencias reproductivas se asocian con altas precipitaciones (Acosta-Galvis, 2012). En el momento de la reproducción los machos de esta especie realizan vocalizaciones en los cuerpos de agua y alrededor de estos, en ocasiones suelen flotar en el agua y emitir cantos generalmente compuestos para atraer a las hembras; esta especie construye nidos de espuma para proteger sus huevos de la desecación, en esta labor pueden participar uno o más individuos. Presentan dimorfismo sexual en el tamaño, los machos que son de menor tamaño que las hembras, se caracterizan por tener un saco vocal subgular simple que les permiten emitir vocalizaciones; presentan además un cayo nupcial en la primera falange en sus extremidades anteriores, con el cual es fácil su diferenciación (Tárano, 2010; Ryan, 1985; Downie, 1988).

*Engystomops pustulosus* es una especie común y de amplia distribución que se encuentra en la categoría <<preocupación menor - LC>> según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), y no se encuentra incluida en los apéndices CITES, los cuales restringen el comercio de especies silvestres amenazadas (CITES, 2017).

**Figura 1.** Aspecto de individuos de *E. pustulosus*, a la izquierda un individuo con tonalidad clara y a la derecha individuos en amplexus con tonalidad oscura. Fuente: Jorge Díaz.



### **Variación morfológica.**

Comprende diferentes procesos de diferenciación de rasgos fenotípicos, ya sea en individuos de una especie (variación intraespecífica) o entre especies (variación interespecífica); en este caso se relaciona solo con características morfométricas cuantitativas y aspectos morfológicos cualitativos como son la pigmentación y las formas biológicas (Salgado-Negret, 2015).

Existen tres tipos de variación intraespecífica según Salgado-Negret (2015):

-Variabilidad entre poblaciones, que hace referencia a las diferencias que pueden existir para una determinada característica, entre poblaciones de una misma especie, Salgado-Negret (2015) propone que ésta puede ser generada por dos procesos, el primero se basa en diferencias genotípicas (adaptación local) y el segundo por respuestas plásticas (norma de reacción) de las especies a la heterogeneidad ambiental, ejemplo de esto es la variación en tamaño o pigmentación reportada para algunas especies de anfibios (Zaragoza, 2013; Baraquet *et al.* 2012).

-Variabilidad entre individuos, esta se da entre los individuos de una población y puede ser generada por el surgimiento de polimorfismos o distintos genotipos y sus respuestas diferenciales ante factores como cambios en su ambiente, disponibilidad de recursos, interacciones bióticas o cambios durante la ontogenia, se observa cuando se desarrollan diferentes morfotipos de una especie dentro de una población

(Vieira *et al.*, 2008).

-Variabilidad dentro del individuo, generada por factores intrínsecos, durante la ontogenia o por mutaciones, esto se ha observado por ejemplo en la pigmentación de gónadas en algunas especies de anfibios, donde se observa en un mismo individuo un testículo melánico y otro sin ningún tipo de pigmentos (Zornosa, 2011).

### **Morfometría lineal.**

La morfometría tradicional sigue siendo una importante herramienta en estudios taxonómicos, ecológicos y ontogénicos, incluso el poder obtener rasgos métricos de los individuos es indispensable para la descripción de nuevas especies. Muchos holotipos de diferentes taxones que han sido descritos hasta la actualidad se han caracterizado principalmente en base a sus dimensiones morfométricas y en muchos casos se hace necesaria la morfometría para delimitar especies, como ocurre por ejemplo con especies de murciélagos del género *Artibeus*, *A. jamaicensis* y *A. planirostris* (Linares, 1998) en las cuales la morfometría puede ayudar a diferenciarlas en campo. La confiabilidad de las medidas morfométricas y del análisis cuantitativo que se haga, está determinado en todos los casos por la precisión de la herramienta de medición y por la experiencia del investigador; aunque para el caso de los individuos que muestran cambios conformacionales después de su muerte o fijación, el tiempo de la medición es de igual forma un aspecto fundamental, pues particularmente en anfibios, se han encontrado grandes diferencias morfométricas entre individuos de una misma especie medidos antes y después de su fijación (Bernal y Clavijo, 2009). Debido a que estos factores pueden aportar una varianza experimental que se conserva hasta los análisis de los datos, ocasionando inconsistencias y errores indeseados, los aspectos antes mencionados deben ser tenidos en cuenta al momento de hacer estudios morfométricos.

### **Morfometría geométrica.**

Es un nuevo enfoque de la morfometría que permite estudiar de manera cuantitativa las formas biológicas, que anteriormente solo podían ser descritas por medio de variables categóricas. Esta técnica se fundamenta en el uso de landmarks que configuran y extraen información sobre la forma de las estructuras biológicas; un landmark o hito puede definirse entonces, como un punto anatómico de referencia, ubicado sobre las estructuras biológicas de interés, con el fin de reconstruir la forma en estudio, que puede ser el ala de un insecto, el cráneo de un vertebrado o estructuras internas y más complejas como los gonópodos de un arácnido (Toro *et al.*, 2010). Cada hito posee coordenadas x,y o x,y,z en planos bi o tridimensionales respectivamente, esto es lo que les da las características espaciales de posición y es así entonces, como un conjunto de landmarks integran la matriz de

morfocoordenadas de la forma en un individuo.

La morfometría geométrica se fundamenta teóricamente en la definición de forma establecida en (1977) por un estadístico británico llamado David Kendall: “*Forma es toda la información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación de un objeto*” y es así como funciona en sus primeras etapas metodológicas todo análisis morfogeométrico, pues al extraer estos componentes solo nos quedamos con la información de la forma propiamente dicha, que es la materia prima de la cual parten los análisis posteriores que incluyen una serie de métodos estadísticos multivariados y univariados (Toro *et al.*, 2010). Como una aproximación matemática a la teoría de la forma pensada por Kendall, surge el método generalizado de Procrustes, que es precisamente una manera de ajustar los datos a un espacio de la forma o espacio de Kendall, en el cual se han retirado de las configuraciones de morfocoordenadas de los individuos los efectos de rotación, escala y posición (Zelditch *et al.*, 2004). Esta resolución matemática permite analizar la forma independientemente de aquellos componentes que no definen la geometría intrínseca del objeto (Toro *et al.*, 2010).

#### **Landmarks o hitos:**

Como ya se mencionó, un hito consta de coordenadas, que permiten la reconstrucción de las formas biológicas dentro de un espacio matemático que puede tener de dos a tres dimensiones, el uso de uno de estos dos tipos de espacios dimensionalmente definidos depende del enfoque de nuestro estudio y de la estructura que se esté analizando.

Existen diferentes tipos de hitos que se definen según sus características espaciales de la siguiente manera (Bookstein, 1991; Toro *et al.*, 2010):

**Hitos tipo 1:** corresponden a hitos localizados en la intersección de tres estructuras, centros de estructuras muy pequeñas, e intersecciones de curvas.

**Hitos tipo 2:** la homología y ubicación de estos hitos se caracterizan en función de la geometría y no de perfiles anatómicos, se ubican en zonas como curvaturas máximas.

**Hitos tipo 3:** corresponden a hitos extremos cuya definición está dada por estructuras distantes.

**Pseudo-hitos:** corresponden a constructos definidos por términos matemáticos y anatómicos, como puntos tangentes a una curva.

**Semi-hitos:** corresponden a puntos localizados en una curva de acuerdo a la posición de otros hitos o estructuras, y que pueden desplazarse levemente en ella. Como los hitos tipo 3 y pseudos-hitos, la información que puede obtenerse de ellos

es menor, y debe considerarse como parte de un todo.

La selección y ubicación de hitos idealmente debe hacerse bajo los siguientes criterios, (propuesto por Zelditch *et al.*, 2004 y Toro *et al.*, 2010):

**Homología:** este criterio implica que los hitos deben estar ubicados sobre estructuras o regiones “homólogas”, es decir aquellas cuyo surgimiento y posterior desarrollo embrionario, siguen patrones de semejanza ancestro-descendiente. Esto permite que cualquier interpretación que se haga de la variación en estos hitos tenga sentido biológico.

**Consistencia en la posición relativa:** Esto quiere decir que la ubicación que se le dé a un determinado hito, no debe variar de un organismo a otro durante el proceso de digitalización, con esto se garantiza que la varianza que estos landmarks aporten sea real (es decir debida a procesos biológicos naturales) y no debida a errores durante el proceso de digitalización.

**Cobertura adecuada de la forma:** los hitos deben reconstruir lo mejor posible la forma en estudio. Una cantidad insuficiente de hitos puede llevar a la pérdida de información valiosa, mientras que una cantidad exagerada de hitos lleva a resultados estadísticamente poco confiables si el tamaño de la muestra es insuficiente.

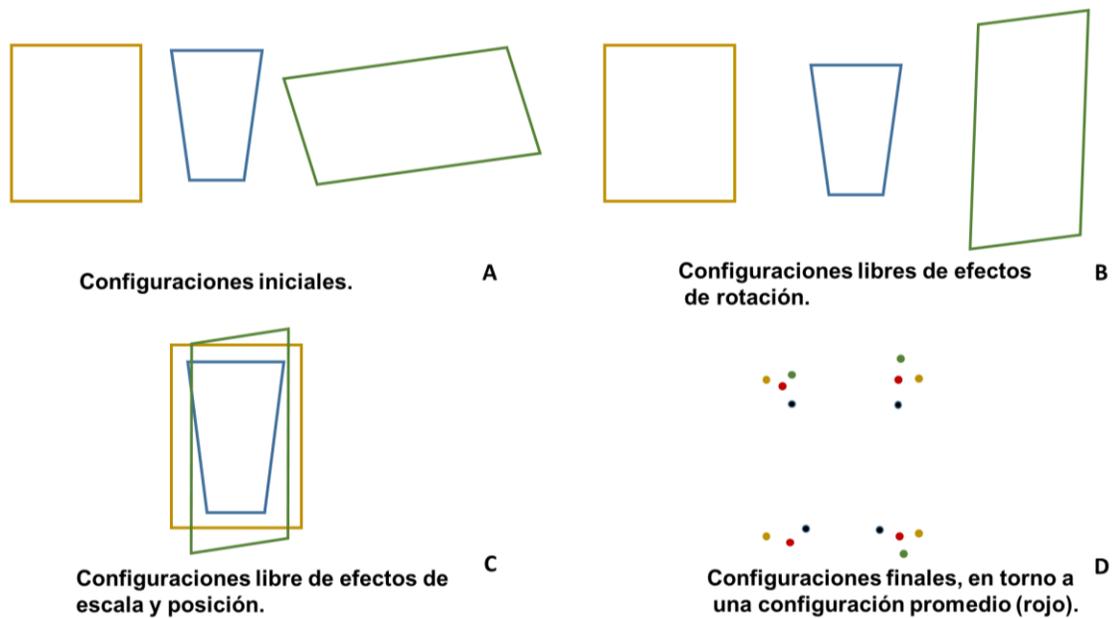
**Repetibilidad:** los hitos deben ser fáciles de localizar y estar claramente definidos para que estos puedan ser ubicados bajo las mismas condiciones en todas las fotografías de los individuos o muestras.

**Coplanaridad:** se debe escoger el plano que aporta información más relevante sobre la variación de la forma biológica en estudio, este criterio es muy importante y más aún cuando se trabaja con estructuras volumétricas.

### **Análisis generalizado de Procrustes**

Este método se emplea con el fin de reducir las diferencias entre configuraciones, estas diferencias geométricas son entendidas como distancias Procrustes, es decir la combinación de los efectos de posición, escala y rotación. Para lograr esto se ubican todas las configuraciones sobre un punto de referencia; durante este proceso los tamaños de centroide de cada configuración varían hasta que sus formas reduzcan las diferencias que poseen; tales cambios de centroide pueden incluir cambios de escala (expansiones y contracciones), rotaciones en torno a su eje y cambios de posición en el espacio (Zelditch *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2010).

**Figura 2.** Ajuste Procrustes aplicado a las configuraciones de tres cuadriláteros (A) a través de rotación, (B) traslación y (C) escalado por medio de la superposición de los centroide. En (D), se muestra las configuraciones de los tres cuadriláteros supe.



### Variables de conformación y Tamaño de centroide

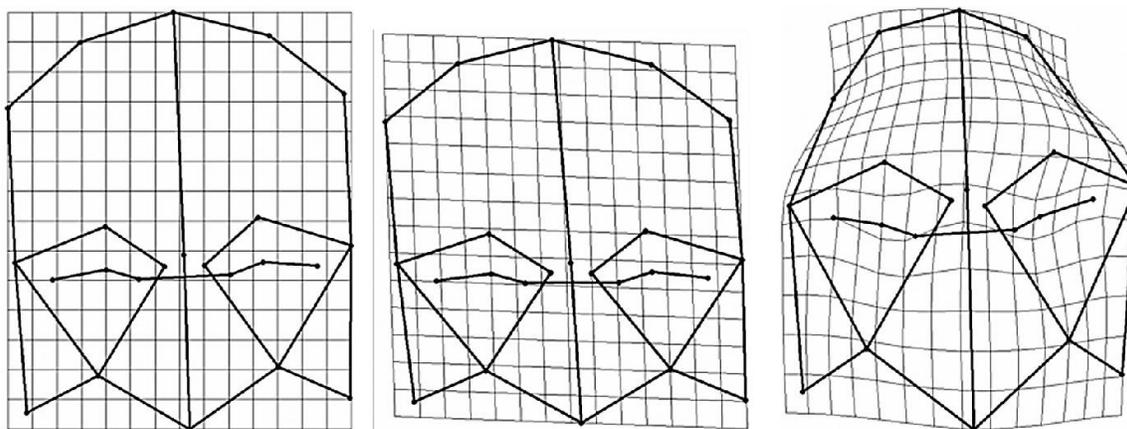
Luego de realizar la superimposición de Procrustes, se extraen de la matriz de morfocoordenadas las variables de la forma que son los *partial warps*, además de la variable de tamaño de centroide. Estas variables ya pueden ser sometidas a análisis estadísticos univariados y multivariados.

Los *partial warps* corresponden a las diferencias netas de la forma medidas en términos de energía de torsión sobre una capa delgada, este término de placa delgada se debe a que en morfometría geométrica la magnitud de los cambios en la forma se determina a través de una función llamada placa delgada TPS siglas del inglés *thin plate spline*, esto se basa en la idea de una lámina de metal infinitamente delgada que puede deformarse con facilidad y contener todos los cambios que se le hagan en función de la magnitud de un conjunto de hitos que se ubican en su superficie, ésta además puede resistir cambios de tipo uniformes o no uniformes, los cuales dan como resultado diferentes configuraciones en TPS (Zelditch *et al.*, 2004; Klingenberg, 2013). Los cambios de tipo uniforme y no uniforme corresponden explícitamente a las variables de conformación.

Los cambios de forma que causan expansiones o contracciones, o cualquier otro efecto que no provoque irregularidades en la rejilla de deformación son definidos como cambios uniformes, mientras que aquellos que causan perturbaciones que afectan el paralelismo de las líneas que forman la rejilla de deformación son los de tipos no uniformes (Toro *et al.*, 2010).

**Figura 3.** Tipos de deformaciones posibles sobre una grilla de deformación según Toro *et al.* (2004); los cambios uniformes mantienen el paralelismo de las líneas en

la rejilla de deformación, mientras que en los cambios de tipo no uniforme, este paralelismo se interrumpe por cambios en la configuración de la rejilla.



**Configuración consenso**

**Deformación uniforme**

**Deformación no uniforme**

Por otra parte, el tamaño de centroide es una estimación de tamaño que se hace a partir de las configuraciones de morfocoordenadas, esta variable es independiente de la forma y su análisis debe partir desde una concepción geométrica del tamaño de la estructura en estudio, pues este equivale a la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado de cada hito a un centroide común (Zelditch *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2010). El algoritmo para representar la variable tamaño de centroide es el siguiente:

$$\text{Tamaño de centroide} = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2 + d^2}$$

Dónde: las variables a, b, c y d, corresponden a las distancias a las que se encuentran ubicados cuatro hitos (A, B, C y D), respecto a un centroide común (Z). Esto para una figura de cuatro lados, el número de hitos en tal caso dependerá de la complejidad de la forma estudiada (Zelditch *et al.*, 2004).

Estos dos tipos de variables, los *partial warps* y el tamaño de centroide o isométrico, son en últimas las que soportan toda interpretación estadística que se haga *a posteriori*. Estas variables son extraídas de los datos antes y durante el análisis generalizado de Procrustes, pues se debe conocer el tamaño de centroide de cada configuración, para luego escalarlas a un tamaño isométrico común, generalmente a 1 y asimismo extraer el efecto de posición antes mencionado, pero todo esto, después del paso inicial, la rotación de cada forma sobre su eje.

## **Análisis de los datos de la forma**

En base a las distancias Procrustes, los *partial warps* y el tamaño de centroide, se puede analizar la variación y covariación de la forma con factores causales, por medio de diferentes métodos estadísticos y de análisis de datos, como son los PCA, CVA, análisis discriminantes, las regresiones y otros que nos permiten probar hipótesis, como el análisis multivariado de la varianza (Toro *et al.*, 2010). El tamaño de centroide puede ser analizado con pruebas de diferencias de media, como t-student y análisis de varianza. Las variables de distancias Procrustes nos permiten probar hipótesis por medio de pruebas de tipo Goodalls F-test y Hotelling. El análisis de *Partial least squares*, es un método que permite evaluar la covariación entre dos conjuntos de datos sin importar sus características, ya sean datos de forma, de longitud o variables ecológicas (Zelditch *et al.*, 2004).

### **Partial least squares (PLS)**

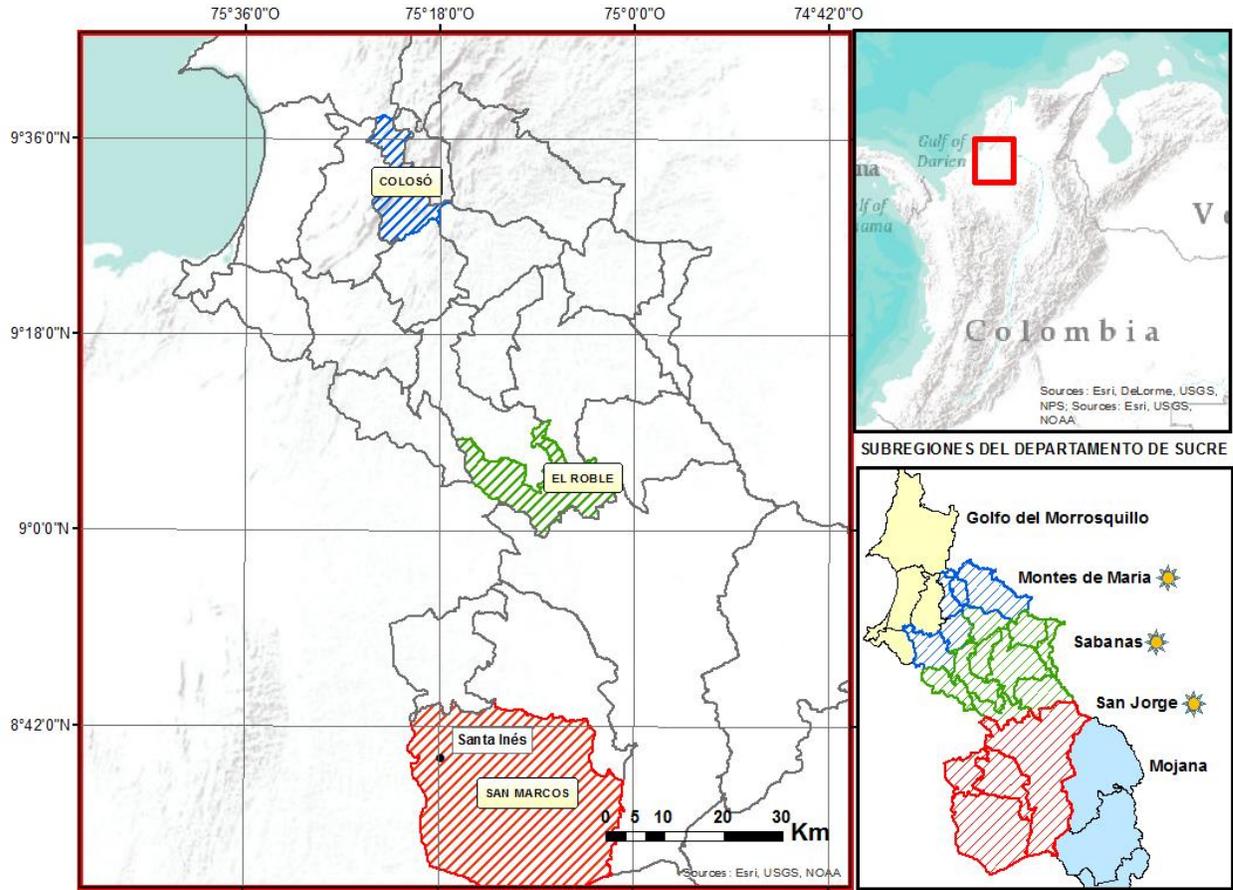
El análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial least squares*), es un método que permite evaluar patrones de covariación entre dos bloques de variables diferentes; puede ser usado en estudios de covariación de dos bloques de variables de forma o entre estas con otro tipo de variables, como son las variables ecológicas o con datos de morfometría tradicional (Rohlf y Corti, 2000). El PLS presenta algunas similitudes con métodos de análisis como la regresión, componentes principales y la correlación canónica y se diferencia en el hecho de que las variables son analizadas con igual peso o simétricamente, mientras que los tres métodos posteriormente mencionados, evalúan el efecto de una variable sobre otra y en esto distinguen entre dependientes e independientes (Zelditch *et al.*, 2004; Rohlf y Corti, 2000).

## **METODOLOGÍA:**

### **Sitios de muestreo**

El presente estudio se realizó en tres poblaciones de *E. pustulosus*, considerablemente separadas unas de otras (distancia máxima entre dos localidades 91,72 km y distancia mínima 43,14 km), abarcando tres de las cinco subregiones fisiogeográficas del departamento de Sucre (figura 4).

**Figura 4.** Ubicación geográfica de las localidades de *Engystomops pustulosus* evaluadas en este estudio.



### **Subregión Montes de María.**

#### **Colosó (Estación Primatológica).**

Está ubicada al suroriente de los Montes de María (9° 29' 53,70" N; 75° 21' 57,82" W), con elevaciones que alcanzan 600 msnm. Hace parte de la subregión Montes de María que está ubicada en la parte nororiental del departamento, conformada por los municipios: Sincelejo, Ovejas, Chalán, Morroa y Colosó; es considerada una zona de bosque seco tropical higrotropofítico y su paisaje característico es de montaña (Holdridge, 1977; Hernández-Camacho, 1992). La temperatura promedio es de 26,8°C, la precipitación varía entre 1.000 y 1.200 milímetros al año; la humedad relativa es del 77%; se da un corto período de lluvias en el primer semestre del año seguido por un breve período seco en los meses de junio y julio, conocido en la región como el "Veranillo de San Juan"; en el segundo semestre se presenta la mayor cantidad de precipitación (Aguilera, 2005; Acosta-Galvis, 2012).

Los sitios de muestreo fueron un cuerpo de agua permanente jagüey al borde del bosque seco y cuerpos de agua temporales al interior del bosque, los valores

promedios de las variables ambientales fueron los siguientes, Temperatura ambiente= 26,40 °C y Humedad relativa= 80%.

### **Subregión Sabanas.**

#### **El Roble.**

Se encuentra ubicado a los 9°06'08,23" N; 75°11'42,08" W; lo conforman numerosas sierras y colinas formando ondulaciones que van desde 70 hasta 185 msnm. Hace parte de la subregión Sabanas, que está situada en la parte central de departamento e inicia a partir del declive de los Montes de María, hasta inicios de la depresión del bajo Cauca y San Jorge, incluye los municipios: Sincé, El Roble, San Pedro, Sampués, Los Palmitos, Galeras, Buenavista, Corozal y San Juan de Betulia. Se le conoce como sabanas antrópicas por la fuerte intervención humana en este sistema ambiental, con predominio de paisaje de lomerío. La temperatura promedio anual es de 27,2°C, la precipitación fluctúa entre 990 y 1.275 mm promedio anual y la humedad relativa es del 80% en promedio (Aguilera, 2005).

Los especímenes fueron recolectados en una zona abierta con pastizales y cuerpos de agua temporales, la temperatura promedio durante las noches de muestreo fue de 29,16 °C y la humedad relativa fue 74%.

### **Subregión San Jorge.**

#### **Corregimiento de Santa Inés (Municipio de San Marcos).**

Corresponde a un pequeño relicto de bosque en la zona de transición entre el bosque seco y el bosque húmedo, que se encuentra en el corregimiento de Santa Inés (8°42'6.41" N; 75°13'3.04" W), con altitud media de 25 msnm. Hace parte de la subregión San Jorge, localizada en la parte suroccidental del departamento y compuesta por los municipios: San Marcos, San Benito Abad, La Unión y Caimito. Esta subregión presenta zonas de bosque húmedo tropical, bosque seco tropical, bosque muy seco tropical y sabanas naturales. La precipitación promedio anual es de 2.300 mm, la temperatura promedio mensual es 28°C y la humedad relativa del 85% (Aguilera, 2005; Barrios y Mercado, 2014).

Las recolectas fueron realizadas en cuerpos de agua temporales (charcos a lo largo de un camino) y permanentes (jagüeyes en finca), en ambos casos existía vegetación herbácea y árboles dispersos, la temperatura promedio fue 28°C y la humedad relativa del 85%. La temperatura y humedad relativa en los sitios de muestreo se midió con un termohigrometro marca Brixco (precisión: 0.1°C y 5% H.R.), las mediciones se hicieron cada media hora durante el tiempo total de muestreo, luego se obtuvieron valores promedios para cada una de las variables.

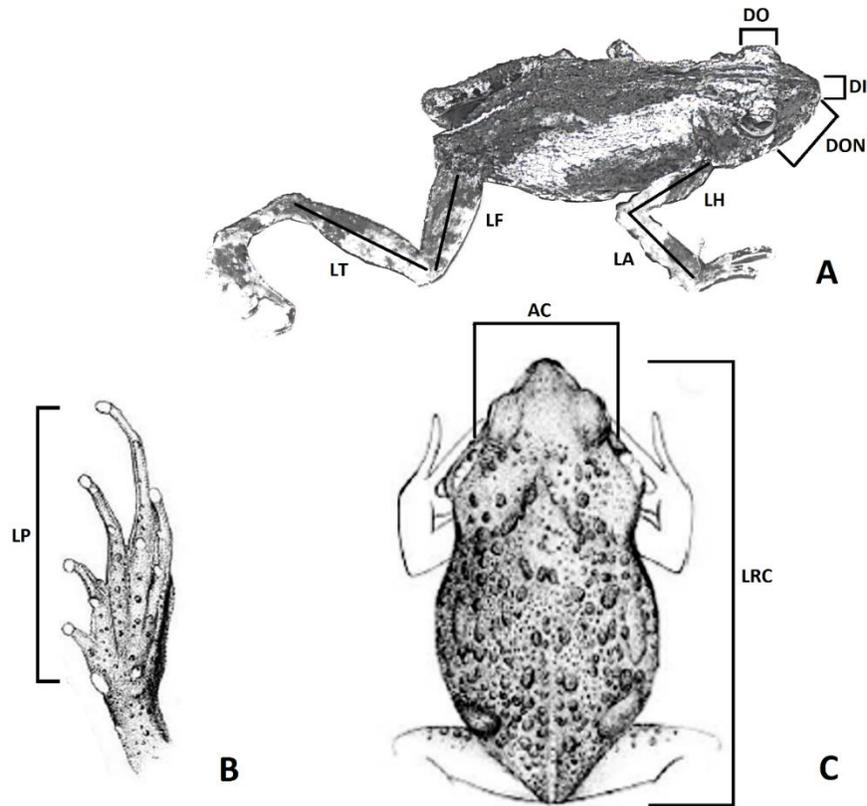
### **Trabajo en campo.**

Entre los meses de junio y agosto del año 2016, se recolectaron por captura manual 30 individuos en cada una de las localidades definidas: Estación Primatológica-Colosó (15 ♂-15 ♀), municipio El Roble (17 ♂-13 ♀) y corregimiento Santa Inés (19 ♂-11 ♀). Los muestreos se llevaron a cabo en salidas de 3 a 4 días y la recolección del material biológico se hizo entre las 19:00 y las 22:00 horas, los individuos capturados se depositaron en bolsas plásticas rotuladas con datos de campo y con suficiente oxígeno, que se cambió cada media hora.

### **Obtención de datos para el análisis de morfometría lineal:**

A todos los individuos se les tomaron las siguientes medidas morfométricas (Figura 5): **AC** ancho de la cabeza, **LRC** longitud rostro cloaca, **DON** distancia ojo fosa nasal, **DI** distancia internarinas, **DO** longitud del ojo, **LF** longitud del fémur, **LH** longitud del húmero, **LA** Longitud del antebrazo, **LT** longitud de la tibia, **LP** longitud del pie. Para ello se usó un calibrador digital marca Stanley con 0,01mm de precisión.

**Figura 5.** Medidas morfométricas usadas en este estudio, en la especie *Engystomops pustulosus*. B y C, Tomadas de Barreto *et al.*, (2005) y modificado por el autor de este trabajo.



Los especímenes capturados fueron sacrificados siguiendo las normas internacionales (HACC, 2004); se extrajeron los estómagos de cada uno de los individuos y se almacenaron en alcohol al 80%. Después de este procedimiento los especímenes se fijaron en formol al 10% por 24 horas y fueron conservados en alcohol al 80%.

### Trabajo en laboratorio

**Caracterización de la Dieta:** se extrajo el contenido de los estómagos de cada espécimen y los ítems se identificaron hasta el nivel taxonómico más bajo posible, mediante el uso de claves taxonómicas para invertebrados acuáticos y terrestres propuestas por Oscoz *et al.* (2011); Thorp y Covich (2001); Schuster (1989); Borrer *et al.* (1989).

### Obtención de datos primarios para el análisis de morfometría geométrica:

El análisis morfogeométrico fue realizado sobre el cráneo de los especímenes, por lo que fue necesario hacer conspicua dicha estructura para su posterior uso. Con el fin de aclarar las estructuras óseas del cráneo, esa región de los especímenes se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 15% por 3 minutos, lo que

permitió degradar tejidos blandos como piel, músculos y vísceras, posterior a esto las estructuras óseas se lavaron con agua destilada; el tejido persistente fue retirado con ayuda de pinzas entomológicas, finalmente las estructuras óseas de los individuos se preservaron en etanol al 80%.

Se tomaron fotografías en la región dorsal del cráneo para cada individuo, con una cámara Cannon Rebel T3i EOS DSLR de 18 megapíxeles, usando un trípode estable y ubicando una hoja milimetrada como fondo y referencia métrica.

Tras ser procesados, todos los especímenes fueron depositados en el Museo de Zoología de la Universidad de Sucre (MZUS).

## **Análisis estadísticos**

### **Morfometría tradicional.**

Se comprobó la normalidad de los datos obtenidos con las 10 medidas morfométricas con un test *a priori* de Shapiro Wilk, al no encontrarse distribución normal en todas las medidas tomadas se procedió a transformar los datos con  $\log_{10}$ , luego se aplicó un ANOVA para comprobar si existen diferencias en las medidas morfométricas de los individuos de las tres poblaciones estudiadas. Se usó análisis de componentes principales (PCA) para observar las tendencias estadísticas de la variación y un Análisis de Variación Canónica en conjunto con Análisis Múltiples de Varianza, para detectar diferencias entre los individuos de las localidades muestreadas.

Con el fin de eliminar la variable derivada de las diferencias en tamaño debidas al sexo, los análisis de varianza (ANOVA), para evaluar diferencias entre poblaciones, fueron realizados por separado, obteniendo resultados para machos y hembras, con relación a las diferencias en los datos de las medidas morfométricas.

Para el análisis de componentes principales y para el MANOVA los datos fueron transformados para reducir el efecto isométrico que contenían las medidas morfométricas, puesto que al analizar los datos sin la bebida transformación ( $\log_{10}$ ) se observó que la mayor parte de la varianza obedecía al tamaño, es decir que el primer componente explicaba casi toda la varianza, lo cual era un 92,02%, mientras que el segundo solo recogía un 3,14% de esta, dejando solo 4,84% distribuido entre 8 componentes restantes; según los criterios de selección de las variables de agrupamiento (CPA y CVA), se debe considerar aquellos componentes que recojan varianza superior a 5% o aquellos factores que tengan Eigenvalue superiores a 1 (Kaiser, 1960).

### **Morfometría geométrica.**

Se creó un archivo de imágenes TPS con el software tpsUtil versión 1.68. (Rohlf, 2015); los landmarks se digitalizaron en el software TpsDig version 2.28 (Rohlf,

2010) usando las fotografías de cada individuo, hasta obtener la configuración de morfocoordenadas x,y de los puntos anatómicos de referencia (PAR) del cráneo; en el proceso se usaron hitos tipo I, III y semilandmarks, según Bookstein (1991). Con el fin de reducir el error y la variación debida a la digitalización, cada fotografía fue digitalizada tres veces y se tomó una configuración promedio para representar un individuo, de igual forma se utilizó el programa MakeFan (Sheets, 2005c) para producir líneas guía, esto permitió aportar mayor precisión al proceso de representación bidimensional del contorno.

**Tabla 1.** Landmarks usados en el análisis de morfometría geométrica y su posición sobre la región dorsal del cráneo.

<b>Hitos</b>	<b>Posición anatómica</b>
1	Margen distal de los procesos nasales, orificio nasal izquierdo.
2	Margen distal de los procesos nasales, orificio nasal derecho.
3	Margen lateral derecho del proceso nasal.
4	Extremo lateral derecho región del proceso orbital, posición más distal.
5	Extremo lateral derecho región del proceso orbital, posición más proximal.
6	Región lateral derecha sobre la aurícula del hueso escamoso.
7	Margen posterior sobre la línea media que divide los frontoparietales.
8	Región lateral izquierda sobre la aurícula del hueso escamoso.
9	Extremo lateral izquierdo región del proceso orbital, posición más proximal.
10	Extremo lateral izquierdo de orbital, posición más distal.
11	Margen lateral izquierdo del proceso nasal.
12	Margen distal del frontoparietal izquierdo ubicado lateralmente.
13	Margen distal del frontoparietal derecho ubicado lateralmente.
14	Margen proximal del frontoparietal izquierdo ubicado lateralmente.
15	Margen proximal del frontoparietal derecho ubicado lateralmente.

Luego se aplicó un ajuste de Procrustes a las configuraciones de la forma del cráneo de los individuos estudiados, para eliminar los efectos de rotación, escala y traslación con ayuda del programa CoorGen (Sheets, 2005a), con esto a su vez fueron extraídas las variables de conformación y el tamaño isométrico.

En el paquete de softwares de IMP (Sheets, 2004) se usó el Análisis de Componentes Principales, como técnica exploratoria para determinar los principales

ejes de variación y se empleó un Análisis de Variación Canónica en conjunto con análisis múltiples de varianza, para detectar diferencias entre los grupos definidos a priori (localidades) y la reclasificación a posteriori basada en las distancias de Procrustes. Las diferencias de la forma entre sexos se determinaron con la prueba Goodalls F, basada en las distancias Procrustes de las configuraciones.

Las diferencias en el tamaño isométrico entre los individuos de las tres localidades se evaluaron mediante una prueba ANOVA, las diferencias para esta variable entre machos y hembras en cada localidad se evaluaron con una prueba t-Student. Estos análisis fueron realizados en el programa PAST versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001).

### **Análisis de dieta.**

Se obtuvieron valores de número de presas, frecuencia de ocurrencia y volumen por cada una de las categorías de presa que componen la dieta de la especie *E. pustulosus*. La frecuencia de ocurrencia se estimó como el número de veces que aparecía un ítem alimentario en los estómagos con contenidos. El volumen V (mm<sup>3</sup>) de cada ítem se calculó con la ecuación del elipsoide:

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{l}{2}\right) \left(\frac{w}{2}\right)^2$$

Se tomaron medidas del largo *l* y ancho *w* de la presa (Dunham, 1983), para ello cada ítem que se encontraba completo se fotografió en un estereoscopio, con una referencia métrica de fondo y luego en base a las fotografías se midieron las dimensiones con ayuda del software TpsDig (Rohlf, 2010).

Se calculó el índice de importancia de categoría de presa (IPS), en base a estómagos agrupados, propuesto por Biavati *et al.* (2004).

$$IPS = \frac{\%N + \%F + \%V}{3}$$

Dónde: %N es porcentaje numérico, %V es porcentaje volumétrico y %F el porcentaje de la frecuencia de encuentro de un tipo de ítem.

Para determinar la diversidad de presas ingeridas por los individuos en cada una de las localidades, se aplicó un índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') (Shannon y Weaver 1949),

$$H' = -\sum pi \ln pi$$

Donde, pi, corresponde a la proporción de presas de la categoría i.

Se comparó la composición y abundancia de la dieta encontrada en los individuos

en cada sitio de muestreo usando el índice de similitud de Jaccard basado en datos de ausencia-presencia y el cuantitativo de Morisita-Horn. Se evaluó la relación de las medidas morfométricas (LRC y AC) y la variable tamaño de centroide con el volumen, longitud y ancho de las presas ingeridas por cada individuo, para ello se usó un modelo de regresión lineal; de igual forma se determinó la existencia de alguna relación lineal entre las variables morfométricas con el número de presas encontradas por estómago y el volumen del contenido estomacal individual. Las variables tróficas se compararon entre sexo en cada localidad con una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Se aplicó un análisis *Partial Least Square* para explorar una posible correlación entre las variables extraídas del análisis de morfometría geométrica y la composición de la dieta en la especie por localidad, siguiendo la metodología propuesta por Adams y Rohlf (2000), se creó una matriz de datos de la dieta, con categorías de orden y abundancia de individuos, esta se importó en el software MorphoJ (Klingenberg, 2011) para su análisis.

## **RESULTADOS.**

### **Morfometría lineal:**

Las medidas morfométricas LRC, AC, LH, LF, LT y LA, mostraron diferencias significativas entre machos y hembras provenientes de la localidad Colosó; las medidas que definen algunas dimensiones de la cabeza como son DI, DON, DO, además de la longitud del pie posterior, no mostraron esta asociación con el sexo (Figura 8; Anexo 5). En las poblaciones de El Roble y Santa Inés, no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras para ninguna de las medidas tomadas (Figura 8; Anexo 5).

Se encontraron diferencias significativas en nueve medidas morfométricas tomadas en machos provenientes de los tres sitios de muestreo, sólo el diámetro del ojo no mostró diferencias significativas (tabla 2; Anexo 6), las diez medidas morfométricas tomadas en hembras de cada localidad mostraron diferenciación significativa (tabla 3; Anexo 6). Los individuos que mostraron mayores dimensiones corporales fueron los de la localidad de Colosó, seguidos por los de El Roble y Santa Inés.

En el análisis de componentes principales, el primer componente principal explicó 76,81 % de la varianza mientras que el segundo solo recogió un 7,78 % (Figura 6), todas las variables aportaron al primer componentes principal, por lo cual es tomado como la varianza debida al tamaño, el segundo componente principal recoge la varianza de las medidas que definen la forma de la cabeza las cuales son DO, DI y DON. Los primeros dos componentes principales recogieron 84,59% de la varianza

total, el resto se repartió entre 8 componentes restantes (Anexo 8).

El gráfico de dispersión en torno a los dos primeros componentes principales permite observar la separación de las poblaciones, aunque con solapamientos de los subconjuntos de datos en el plano construido en base a las medidas morfométricas (Figura 6).

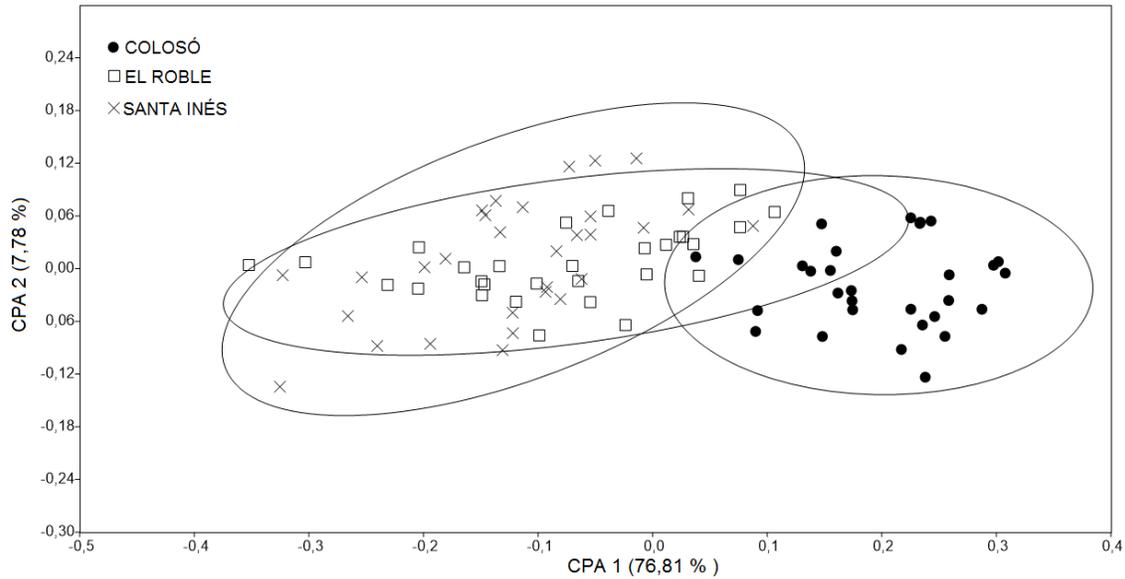
**Tabla 2.** Variables morfométricas de machos de *E. pustulosus* (media  $\pm$  desviación estándar) en las localidades evaluadas, la medida **DO** no mostró diferencias significativas (en negro \*N/S) entre localidades.

Medidas (mm)	Localidades		
	COLOSÓ (n=15)	EL ROBLE (n=17)	SANTA INÉS (n=19)
LRC	30,65 $\pm$ 1,30	26,80 $\pm$ 1,80	24,61 $\pm$ 0,96
AC	8,95 $\pm$ 0,34	7,35 $\pm$ 0,58	7,12 $\pm$ 0,34
DI	1,87 $\pm$ 0,16	1,61 $\pm$ 0,14	1,71 $\pm$ 0,20
DON	4,61 $\pm$ 0,53	4,10 $\pm$ 0,61	3,95 $\pm$ 0,38
<b>DO</b> *N/S	2,86 $\pm$ 0,32	2,68 $\pm$ 0,24	2,65 $\pm$ 0,33
LH	7,90 $\pm$ 0,63	6,51 $\pm$ 0,56	6,75 $\pm$ 0,45
LF	12,31 $\pm$ 0,83	11,01 $\pm$ 0,50	10,63 $\pm$ 0,72
LT	14,17 $\pm$ 0,80	11,53 $\pm$ 0,53	11,23 $\pm$ 0,69
LP	14,57 $\pm$ 0,76	12,03 $\pm$ 0,73	11,32 $\pm$ 0,66
LA	8,18 $\pm$ 0,62	6,42 $\pm$ 0,36	6,43 $\pm$ 0,32

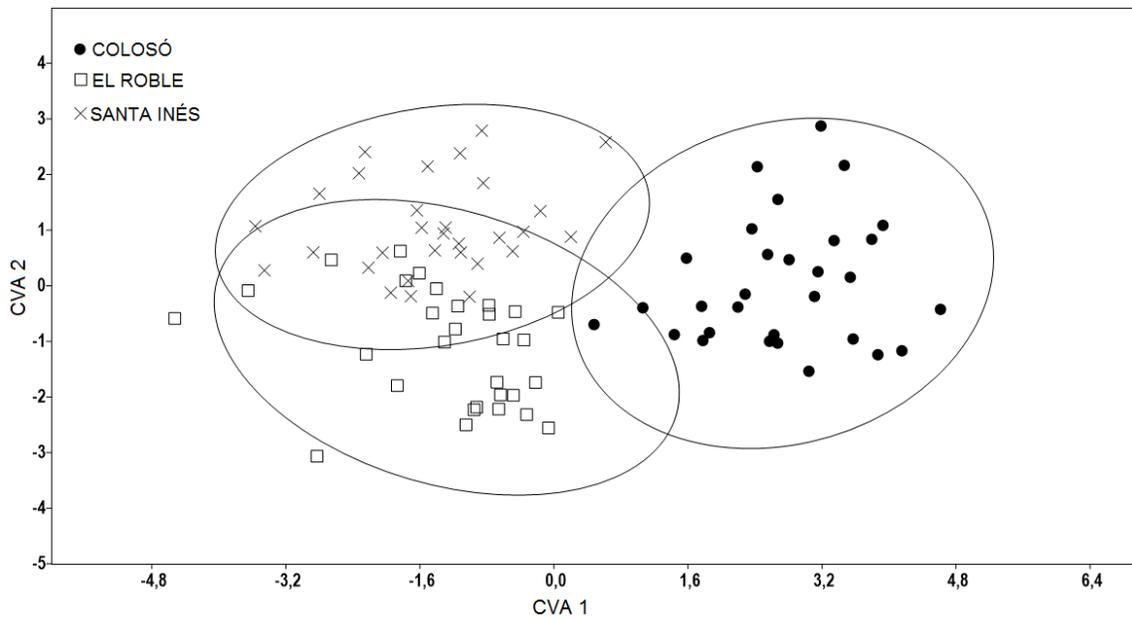
**Tabla 3.** Variables morfométricas (media  $\pm$  desviación estándar) en hembras de *E. pustulosus* por localidad.

Medidas (mm)	Localidades		
	COLOSÓ (n=15)	EL ROBLE (n=13)	SANTA INÉS (n=11)
LRC	35,01 $\pm$ 1,3	28,15 $\pm$ 3,70	25,77 $\pm$ 2,29
AC	9,39 $\pm$ 0,50	7,6 $\pm$ 0,89	7,17 $\pm$ 0,85
DI	1,97 $\pm$ 0,24	1,59 $\pm$ 0,21	1,63 $\pm$ 0,29
DON	4,89 $\pm$ 0,46	4,20 $\pm$ 0,43	3,87 $\pm$ 0,62
DO	2,95 $\pm$ 0,27	2,72 $\pm$ 0,45	2,47 $\pm$ 0,44
LH	8,94 $\pm$ 0,51	6,94 $\pm$ 0,94	6,71 $\pm$ 0,66
LF	14,11 $\pm$ 1,20	11,07 $\pm$ 0,98	10,73 $\pm$ 1,01
LT	15,03 $\pm$ 0,66	11,60 $\pm$ 1,11	11,09 $\pm$ 1,02
LP	15,26 $\pm$ 1,07	11,97 $\pm$ 1,29	11,04 $\pm$ 1,10

**Figura 6.** Gráfico de dispersión en torno a los dos primeros componentes principales del PCA basado en las diez medidas morfométricas tomadas de los individuos de la especie *E. pustulosus*, n=90.

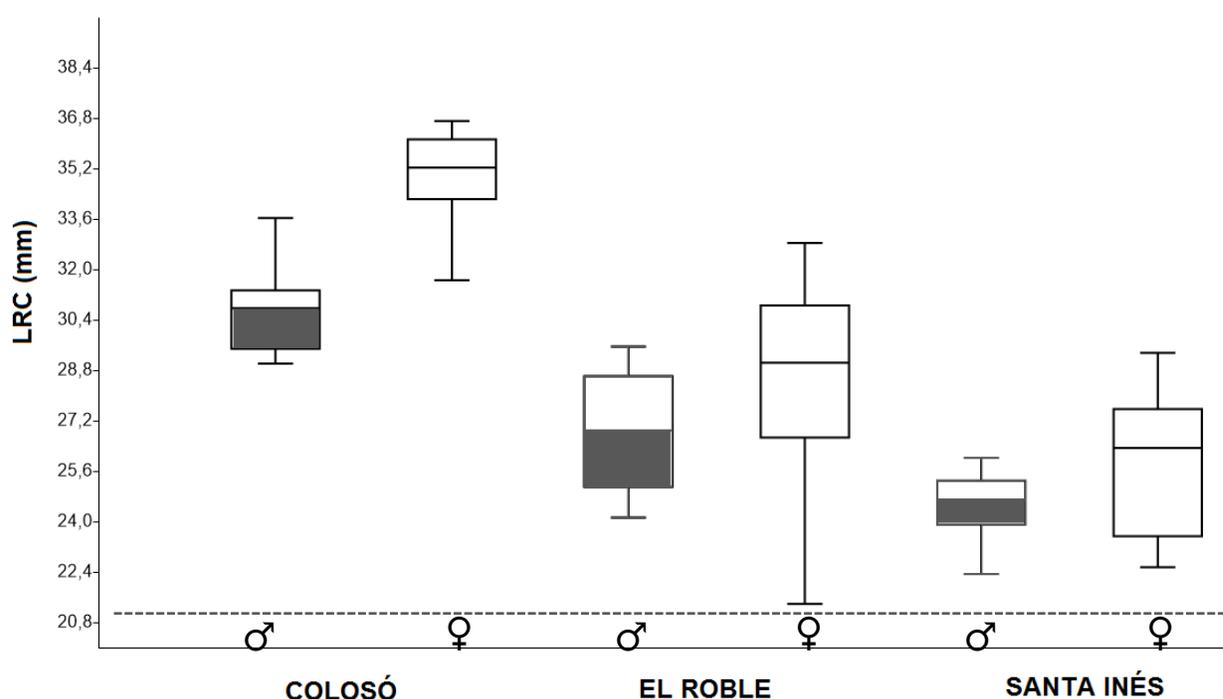


**Figura 7.** Gráfico de dispersión en torno a las dos primeras variables canónicas basado en las diez medidas morfométricas tomadas de los individuos de la especie *E. pustulosus*, n=90 (elipse de confianza de 95%).



Los valores de la prueba Manova/CVA muestran diferencias significativas entre los individuos de las localidades evaluadas: Wilk's  $\lambda = 0,1138$ ,  $gl_1 = 20$ ,  $gl_2 = 156$ ,  $F = 15,33$ ,  $p < 0,001$ , Axis 1 = 3,86, Axis 2 = 0,809. Se logra discriminar los individuos pertenecientes a cada localidad en el gráfico de dispersión del CVA (Figura 7); así mismo los porcentajes de reclasificación para las tres localidades fueron superiores a 83%, estos se muestran en la Tabla 4 y el Anexo 9.

**Figura 8.** Variación de la longitud rostro cloaca (LRC) en adultos de *Engystomops pustulosus*. La barra central indica la media y la longitud de la caja representa la dispersión de los datos en torno a este valor.



### Morfometría geométrica:

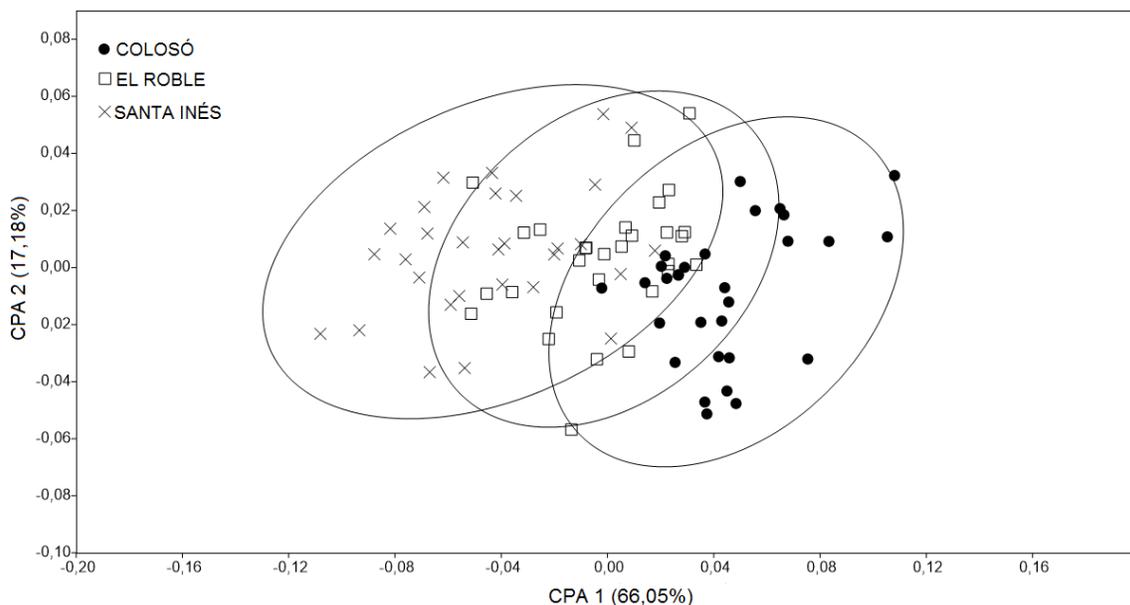
Se encontraron diferencias significativas para el tamaño de centroide de la región dorsal del cráneo entre individuos de *E. pustulosus* de las tres poblaciones estudiadas (ANOVA:  $gl: 2$   $F = 45,18$   $p < 0,001$ ). Los valores medios para cada localidad son los siguientes: Colosó =  $3,44\text{mm} \pm 0,29$ , El Roble =  $2,72\text{mm} \pm 0,47$  y Santa Inés =  $2,52\text{mm} \pm 0,23$ .

Con el análisis de componentes principales se logran discriminar las tres localidades, los resultados que se muestran (Figura 9) permiten referenciar los principales ejes de variación de las configuraciones de morfocoordenadas de los individuos de cada población, en base a las diferencias en la forma de la región

dorsal del cráneo, la varianza explicada por el primer componente principal es del 66.05% y por el segundo 17,18% (Anexo 11).

No se encontraron diferencias para el tamaño isométrico de la región dorsal del cráneo de machos y hembras en ninguna de las tres localidades evaluadas ( $p > 0,05$ ). La prueba Goodall-F, basada en las distancias Procrustes de las configuraciones, muestra diferencias altamente significativas en la forma del cráneo de machos y hembras ( $F = 4.98$   $gl = 26.00$ ,  $728.00$   $p < 0,001$ ) de la localidad de Colosó, no se encontraron diferencias en la forma del cráneo asociada al sexo en los individuos de las localidades de El Roble y Santa Inés, (El Roble:  $F = 1.07$   $gl = 26.00$ ,  $728.00$   $p > 0,05$  y Santa Inés:  $F = 0.35$   $gl = 26.00$ ,  $728.00$   $p > 0,05$ ).

**Figura 9.** Gráfico de dispersión en torno a los dos primeros componentes principales de la región dorsal del cráneo de los individuos de la especie *E. pustulosus*,  $n = 90$ .

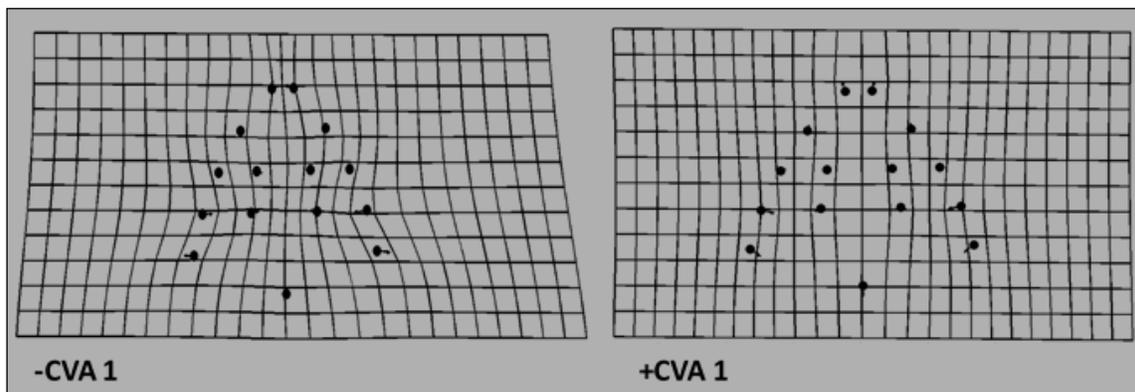
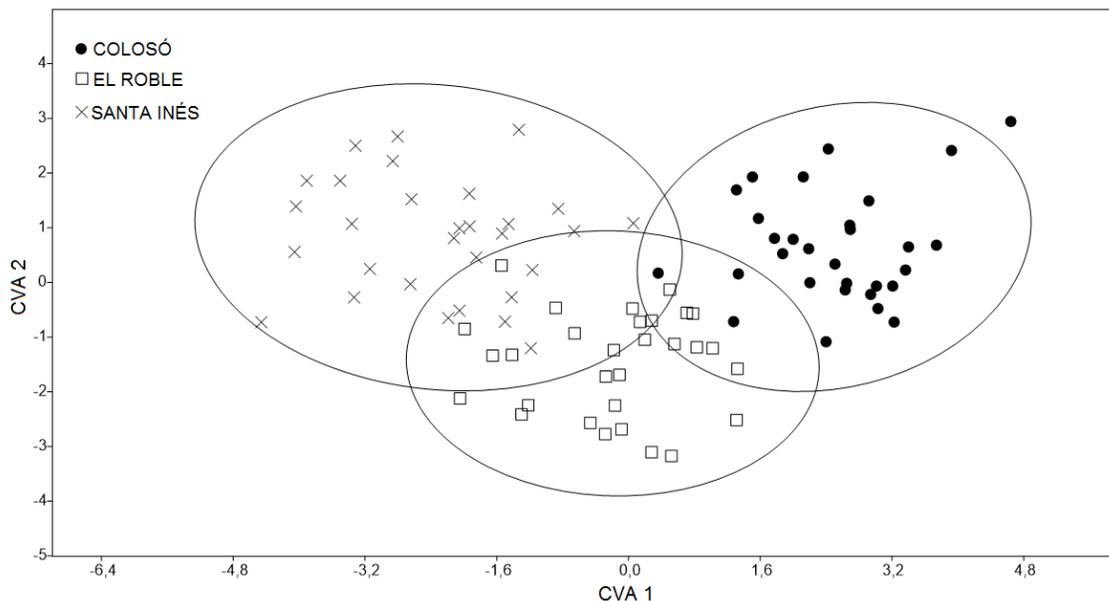


Las diferencias morfogeométricas fueron significativas al ser evaluadas con una prueba CVA/Manova, los siguientes son los resultados de reclasificación, Axis 1  $\Lambda = 0.0987$ ,  $\chi^2 = 172.5080$   $gl = 52$   $p < 0,001$  y Axis 2  $\Lambda = 0.4878$ ,  $\chi^2 = 53.4767$   $gl = 25$   $p < 0.001$ . La reclasificación se realizó a partir de las distancias de Mahalanobis obtenidas durante el análisis de variación canónica realizado en conjunto con el análisis múltiple de varianza, en base a las conformaciones de morfocoordenadas de la región dorsal del cráneo. La reasignación hecha para los individuos de las tres localidades fue casi perfecta, pues se obtuvieron valores porcentuales de reclasificación correcta iguales y superiores a 90% (Tabla 4; Anexo 13).

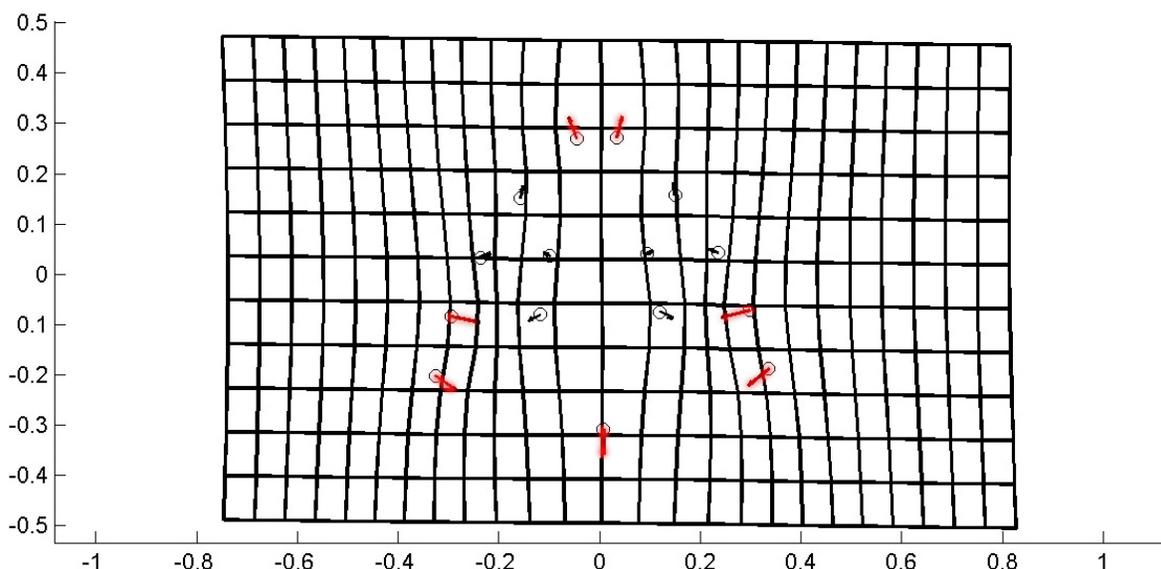
Las principales diferencias en la forma del cráneo en individuos de los tres sitios muestreados estuvieron localizadas a nivel del margen distal de los procesos

nasales (hitos: 1 y 2), en los extremos laterales donde se encuentran la región del proceso orbital y la aurícula del hueso escamoso (hitos: 5, 6, 8 y 9), en la parte más proximal (Figuras 10 y 11; Anexo 12). Otra región muy variable es el margen posterior sobre la línea media que divide los frontoparietales (hito: 7). Se encontró que los individuos de la localidad de Colosó poseen cabezas más ensanchadas, mientras que, en la localidad más distante, Santa Inés, se observó un menor ensanchamiento en la región lateral del proceso orbital y cráneos más alargados (Anexo 12), los individuos de la localidad El Roble fueron considerados como morfotipos intermedios en función de la tendencia de variación de la forma de cráneo.

**Figura 10.** Análisis de variación canónica entre localidades, basado en la varianza de los componentes de la forma de la región dorsal del cráneo de *Engystomops pustulosus*, n=90 (elipse de confianza de 95%).



**Figura 11.** Rejilla de deformación, en rojo se muestran los landmarks que aportan mayor varianza entre las configuraciones de morfocoordenadas del cráneo de los individuos de las tres localidades. Las diferencias de la forma son expresadas como deformaciones de una forma promedio en una rejilla deformable.



**Tabla 4.** Porcentaje de reclasificación correcta obtenido a partir del CV/Manova de las medidas morfométricas y las matrices de morfocoordenadas de los individuos por localidad.

Técnica de análisis	Colosó	El Roble	Santa Inés	Promedio
Morfometría tradicional	96,67	83,33	90,00	<b>90,00</b>
Morfometría geométrica	93,33	96,67	90,00	<b>93,33</b>

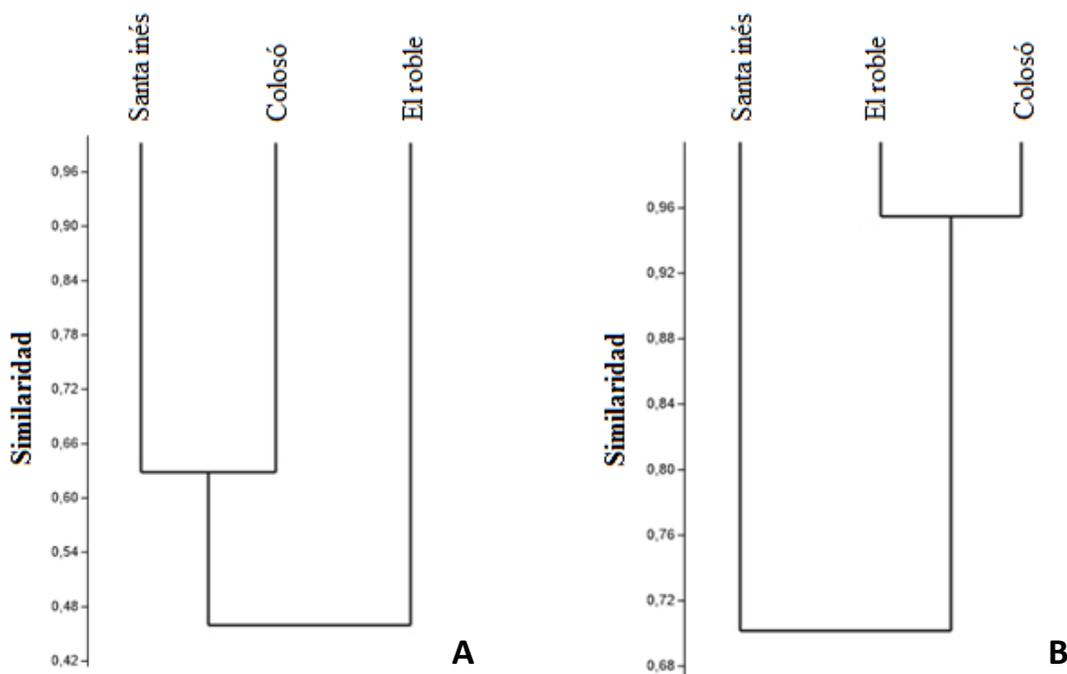
### Análisis de la dieta:

De 30 estómagos revisados el 66,67% contenían presas en la localidad de Colosó, 63,33% en El Roble y 73,33% en Santa Inés. La dieta de la especie entre las tres localidades evaluadas estuvo compuesta por 11 categorías alimentarias (Tablas 5, 6 y 7); las termitas, hormigas y ácaros fueron los tipos de presas mayormente ingeridos por la especie. El número promedio de ítems encontrados por estómagos en la localidad de Colosó fue 21,25 (rango= 1-93), en El Roble 44,21 (rango= 1-114) y en Santa Inés 7,45 (rango= 1-46), el volumen promedio del contenido estomacal en las tres localidades fue: Colosó, 74,461 mm<sup>3</sup> (rango= 0,97-421,85 mm<sup>3</sup>); El Roble, 184,95 mm<sup>3</sup> (rango= 0,44-515,28 mm<sup>3</sup>); Santa Inés, 17,28 mm<sup>3</sup> (rango= 0,1-190,74 mm<sup>3</sup>).

En la localidad de Santa Inés, la diversidad presas según el índice de Shannon-Weaver fue  $H' = 1,24$ , las categorías de presa más importantes en esta población fueron Termitidae (IPS = 53,76%) y Formicidae (IPS= 38,24%); en la localidad de El Roble, se registró el valor más bajo de la diversidad de Shannon para las presas ingeridas ( $H' = 0,26$ ), las categorías de presa más importantes fueron Termitidae (IPS = 96,39%) y Formicidae (IPS= 10,90). Para Colosó la diversidad fue de ( $H' = 0,64$ ) y fueron encontradas 7 categorías de presa, tres más que en la población de El Roble, las presas de importancia para los individuos en Colosó fueron Termitidae (IPS= 83,96%) y ácaros Trombidiformes (IPS= 11,59%) (Figura 13).

Se encontraron diferencias entre localidades en cuanto a la composición y abundancia de presas ingeridas (Figura 12). El índice de similitud de Jaccard arrojó valores bajos que indican diferencias entre las localidades, Santa Inés-Colosó (Índice Jaccard= 63,63%), Santa Inés-El Roble (Índice Jaccard= 36,36%) y El Roble-Colosó (Índice Jaccard= 57,14%). Por otro lado el índice de Morisita-Horn, indica que hay similitudes entre las localidades de Colosó y El Roble en términos de la abundancia de individuos de cada categoría de presa (Morisita-Horn: 95,47%), los individuos de estas dos poblaciones difieren en su dieta respecto a los de la localidad de Santa Inés, donde se observó una mayor equitatividad (Morisita-Horn; Santa Inés-El Roble: 67,59%, Santa Inés-Colosó: 72,73%).

**Figura 12.** Grado de similitud de las tres localidades en base a la dieta de *E. pustulosus*, según **A.** coeficiente de similitud de Jaccard **B.** Índice de Morisita-Horn.



La familia Termitidae estuvo representada por dos especies pertenecientes a dos

géneros comunes en tierras bajas del Caribe colombiano, *Rhynchotermes* y *Nasutitermes*. Ambas especies fueron registradas como presas en la dieta de *E. pustulosus* en las localidades de El Roble y Santa Inés, mientras que en los estómagos de los individuos provenientes de Colosó fue observada sólo la especie del primer género. Las termitas fueron el tipo de presa con mayor aporte numérico y volumétrico a la dieta de la especie en los tres sitios muestreados en el departamento de Sucre. El volumen promedio de ítems de esta categoría fue 3,88 mm<sup>3</sup> (rango= 3,25-4,52 mm<sup>3</sup>), así mismo la longitud y el ancho promedio obtenidos fueron 4,19 mm (rango= 3,86-4,52 mm) y 1,32mm (rango= 1,27-1,38 mm), respectivamente.

Dentro de la dieta de los individuos de Santa Inés, se identificaron plenamente un total de 6 géneros de Formicidae, los de mayor importancia en el porcentaje numérico de la familia fueron *Solenopsis* y *Pheidole* (Figura 14). Para la localidad de El Roble se identificaron dos géneros, *Cyphomirmex* y *Pheidole*, un tercer morfotipo no se pudo identificar taxonómicamente hasta dicha categoría pero fue clasificado en la subfamilia Myrmicinae, al igual que los dos géneros antes mencionados. Los dos géneros conocidos son los de mayor importancia numérica en la dieta a nivel de la familia Formicidae en esta población. En la dieta de los individuos de Colosó, las hormigas no fueron un ítem de gran importancia, los tres individuos encontrados en los estómagos pertenecían a la subfamilia Myrmicinae. La dimensiones y el volumen promedio de los ítems clasificados como Formicidae fueron, longitud: 2,77 mm (rango= 1,46-5,61 mm); ancho: 0,62 mm (rango= 0,33-1,43 mm) y volumen: 1,14 mm<sup>3</sup> (rango= 0,08-6,10 mm<sup>3</sup>).

**Tabla 5.** Categorías de presa ingerida por individuos provenientes de la localidad de Santa Inés, Ni = número de individuos por categoría de presa, %N = porcentaje de composición numérica, F= frecuencia de aparición, %F = frecuencia de aparición porcentual, V = volumen de cada categoría, %V = volumen porcentual, IPS= índice de importancia de categoría de presa.

CATEGORIAS DE PRESA		n=20						
ORDEN	FAMILIA	Ni	%N	F	%F	V	%V	IPS
Hymenoptera	Formicidae	71	39,89	15	68,18	23,55	6,65	38,24
Coleoptera	Staphylinidae	2	1,12	2	9,09	1,83	0,52	3,58
	Curculionidae	1	0,56	1	4,55	5,18	1,46	2,19
	Scarabaeidae	1	0,56	1	4,55	4,34	1,23	2,11
	Larva coleóptero	1	0,56	1	4,55	3,96	1,12	2,08
	Tenebrionidae	2	1,12	2	9,09	0,45	0,13	3,45
	Dytiscidae	1	0,56	1	4,55	5,71	1,61	2,24
Isoptera	Termitidae	78	43,82	7	31,82	303,03	85,63	53,76
Acari	Trombidiforme	19	10,67	3	13,64	4,39	1,24	8,52

Gastropoda	Hygrophila	1	0,56	1	4,55	0,55	0,16	1,75
Psocoptera	Psocidae	1	0,56	1	4,55	0,89	0,25	1,79
TOTAL		178						

**Tabla 6.** Categorías de presa ingerida por individuos provenientes de la localidad de El Roble, Ni = número de individuos por categoría de presa, %N = porcentaje de composición numérica, F= frecuencia de aparición, %F = frecuencia de aparición porcentual, V = volumen de cada categoría, %V = volumen porcentual, IPS = índice de importancia de categoría de presa.

CATEGORIAS DE PRESA		n=19						
ORDEN	FAMILIA	Ni	%N	F	%F	V	%V	IPS
Hymenoptera	Formicidae	9	1,07	6	31,58	2,06	0,06	10,90
Coleoptera	Larva coleóptero	1	0,12	1	5,26	0,54	0,02	1,80
Isoptera	Termitidae	789	94,72	18	94,74	3538,34	99,72	96,39
Acari	Trombidiforme	43	5,16	3	15,79	9,46	0,27	7,07
TOTAL		833						

**Tabla 7.** Categorías de presa ingerida por individuos provenientes de la localidad de Colosó, Ni = número de individuos por categoría de presa, %N = porcentaje de composición numérica, F= frecuencia de aparición, %F = frecuencia de aparición porcentual, V = volumen de cada categoría, %V = volumen porcentual, IPS = índice de importancia de categoría de presa.

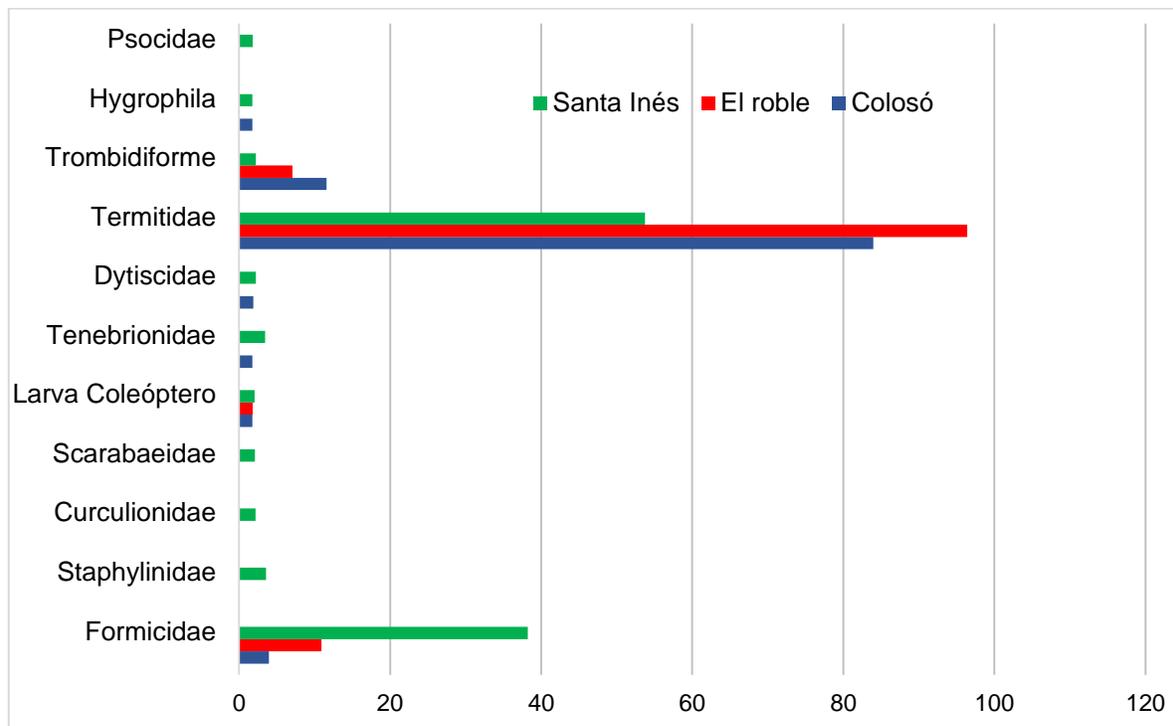
CATEGORIAS DE PRESA		n=22						
ORDEN	FAMILIA	Ni	%N	F	%F	V	%V	IPS
Hymenoptera	Formicidae	3	0,71	2	10,00	18,03	1,21	3,97
Coleoptera	Tenebrionidae	1	0,24	1	5,00	0,54	0,04	1,76
	Dytiscidae	1	0,24	1	5,00	5,71	0,38	1,87
	Larva coleóptero	1	0,24	1	5,00	0,97	0,07	1,77
Isoptera	Termitidae	319	75,06	16	80,00	1441,88	96,82	83,96
Acari	Trombidiforme	99	23,29	2	10,00	21,78	1,46	11,59
Gastropoda	Hygrophila	1	0,24	1	5,00	0,31	0,02	1,75
TOTAL		425						

Se encontraron diferencias significativas en el número de presas por estómagos y el volumen del contenido estomacal en las tres localidades, número de ítems

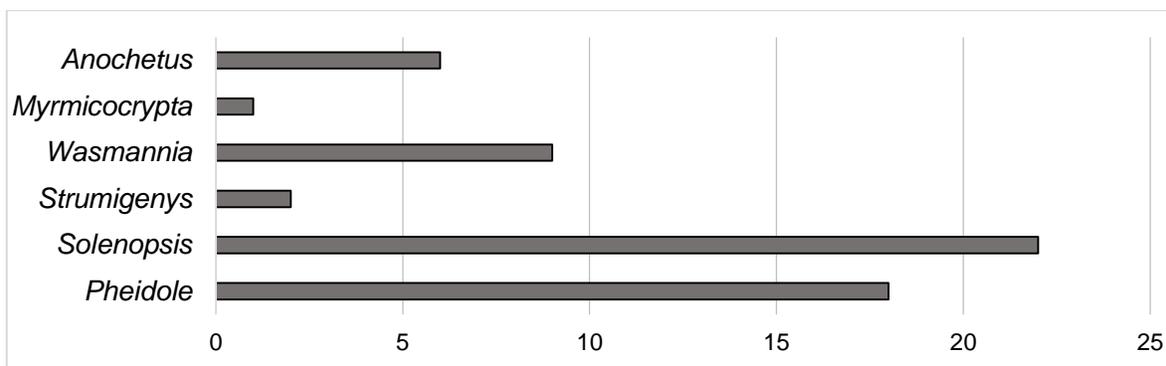
(ANOVA  $F= 8,54$   $gl=2$   $p<0,001$ ) y volumen (ANOVA  $F= 13,92$   $gl=2$   $p<0,001$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar características morfológicas como: la longitud, el ancho y el volumen de las presas ingeridas por los individuos en los tres sitios muestreados (Tabla 8).

Las variables morfométricas LRC, AC y la variable del análisis de morfometría geométrica, Tamaño de Centroide, no mostraron correlación con características de la dieta como son el número de ítems por estómago y el volumen de contenido estomacal, tampoco se encontró correlación de las variables, longitud, ancho y volumen de las presas ingeridas con las variables morfométricas de los individuos de *Engystomops pustulosus* y aunque el valor de p fue menor a 0,05 en la mayoría de las correlaciones, los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ;  $n=61$ ) indican una muy baja correlación o inexistencia de la misma (Anexo 17).

**Figura 13.** Índices de importancia para las categorías de presa (IPS) consumidas por *E. pustulosus* en las tres localidades.



**Figura 14.** Principales géneros de hormigas encontrados en la dieta de los individuos de la localidad de Santa Inés.

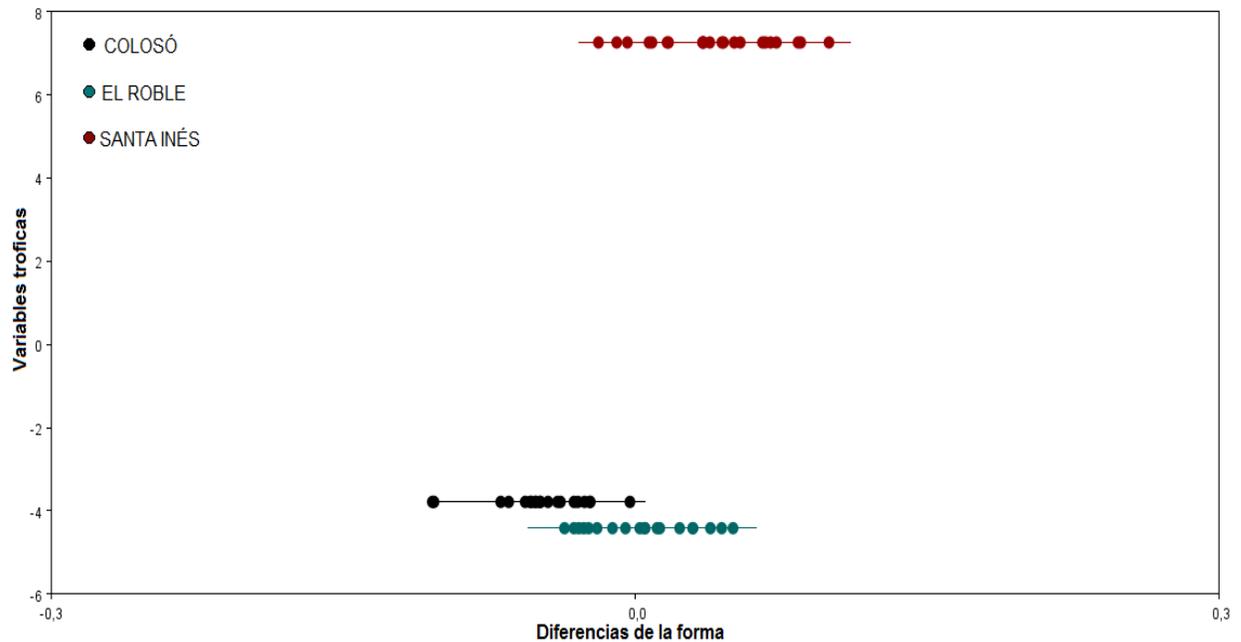


**Tabla 8.** Valores promedio de longitud, ancho y volumen de las presas ingerida por los individuos de las tres localidades evaluadas.

localidades	Longitud de presa (mm)	Ancho de presa (mm)	Volumen (mm <sup>3</sup> )
Colosó	3,09 ± 1,52	1,01 ± 0,47	2,44 ± 2,58
El Roble	2,59 ± 1,30	0,82 ± 0,41	1,49 ± 1,89
Santa Inés	2,90 ± 1,26	0,88 ± 0,40	1,83 ± 1,97
ANOVA	F= 0,20 gl= 2 p>0,05	F= 0,36 gl= 2 p>0,05	F= 0,31 gl= 2 p>0,05

El análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) recogió toda la covariación en solo dos dimensiones, que se repartieron porcentualmente de la siguiente manera PLS1= 99,976% y PLS2= 0,024%. El coeficiente de asociación entre los bloques de variables fue de 0,382. Solo tres categorías de presa aportaron covariación a las dos dimensiones (PLS1 y PLS2) en el *partial least squares*, estas fueron a su vez las de mayor importancia numérica en la dieta de la especie en las tres localidades evaluadas, es decir Hymenoptera, Acari e Isoptera (Tabla 9), el porcentaje de correlación explicado por el PLS 1 fue 64,1%, mientras que para el PLS 2 fue de 50,4%. La primera dimensión recibe aportes en carga positiva de órdenes Hymenoptera y Acari y aportes negativos en Isoptera, estas tres categorías permiten definir los individuos en base a las características de su dieta en más especializado en el consumo de termitas (Colosó y El Roble) y menos especializado que además incluyen hormigas y ácaros (Santa Inés) (Figura 15).

**Figura 15.** Gráfico del PLS1 correspondiente al primer bloque (variables de la forma) versus el PLS1 del segundo bloque (variables tróficas), de los individuos de *E. pustulosus* (n=61) de las tres localidades muestreadas (en base a una correlación de 64,1%).



**Tabla 9.** Resultados del análisis de mínimos cuadrados parciales que evalúa la covariación de los componentes de la forma del cráneo de los individuos y la composición de la dieta de *E. pustulosus*.

Variable	Dimensiones	
	PLS1	PLS2
Hymenoptera	0,273	-0,221
Acari	0,727	-0,590
Isoptera	-0,630	-0,777
Singular value	0,164	0,003
Correlación	0,641	0,504

## DISCUSIÓN:

### Morfometría lineal:

Los resultados encontrados en este estudio indican que *Engystomops pustulosus* presenta variabilidad en talla entre poblaciones, esto concuerda con el trabajo de Cannatella y Duellman (1984), en el cual se reporta que *E. pustulosus* (en su trabajo *Physalaemus pustulosus*), muestra variación intraespecífica para la medida morfométrica longitud rostro-cloaca (LRC), con la cual estos autores encontraron diferencias significativas entre poblaciones y entre sexos; cabe mencionar que en algunas localidades los tamaños de muestras mínimos analizados eran hasta de 5 individuos, lo cual pudo haber tenido alguna influencia en los análisis estadísticos

de Cannatella y Duellman (1984), puesto que tamaños de muestra pequeños no permiten en muchos casos evidenciar las diferencias reales que existen entre grupos de individuos, además la proporción de machos era  $\frac{3}{4}$  del total de su muestra en la mayoría de las localidades, lo cual es un margen estrecho en términos de equitatividad estadística para hacer comparaciones de medias (Zaragoza, 2013). Además de las diferencias morfométricas, Cannatella y Duellman (1984), reportan que la especie objeto de estudio muestra una alta variabilidad fenotípica, al exhibir diferencias en los patrones de coloración dorsal y ventral, así como en el patrón de pústulas de la región dorsal. Los cambios en las condiciones ambientales afectan la morfología de los anfibios, dada sus características de historia natural y su fisiología térmica (Tryjanowski *et al.* 2006).

Las tendencias geográficas de variación en anfibios reportadas en la literatura generalmente se asocian con la altitud, latitud o con la temperatura (Castellano *et al.*, 2000; Morrison y Hero, 2003; Amor *et al.*, 2009; Baraquet *et al.*, 2012). En los casos en que no hay asociación entre la talla y las variables mencionadas, se ha planteado que las diferencias ambientales locales y el aislamiento geográfico son los principales desencadenantes de la variación en el fenotipo (Zaragoza, 2013; Silva *et al.*, 2008). Para el estado de Goiás en Brasil, Silva *et al.* (2008) reportaron diferencias morfométricas y genéticas en nueve poblaciones de *Eupemphix nattereri* (= *Physalaemus nattereri*; ver Faivovich *et al.*, 2012), las causas de la variación en dicha especie según los autores podían ser el resultado de factores ambientales locales, fluctuaciones genéticas y aislamiento geográfico; sus resultados indicaron que el grado de diferencias genéticas y fenotípicas estaba positivamente correlacionado con la distancia geográfica de las poblaciones, y que en los sitios más distantes el flujo genético se cortaba.

Se considera que las diferencias en la estructura vegetal y uso del suelo, en las tres localidades del presente trabajo, generan también características microclimáticas particulares en cada una de las zonas; se identificaron ambientes naturales conservados en la localidad de Colosó y zonas más transformadas en el municipio El Roble, en la primera se da predominio de vegetación boscosa y en la otra de sábanas antropizadas y paisajes rurales. Se cree que estas diferencias en la estructura vegetal pueden ser un desencadenante importante de la plasticidad fenotípica en la especie, es decir el surgimiento de morfotipos diferentes (en términos morfométricos) en respuesta a un gradiente ambiental. Silva *et al.* (2008) han mencionado que la estructura de la vegetación en cada localidad es un factor que influye en la diferenciación morfológica en especies de anfibios; sin embargo, estos mismo autores discuten que los factores ecológicos, ontogenéticos y genéticos actúan en conjunto y generan las diferencias intraespecíficas observadas en especies de anfibios.

En lo referente al análisis morfométrico entre sexos, sólo los individuos de Colosó, mostraron dimorfismo sexual en relación con el tamaño corporal, siendo las hembras de mayor talla que los machos; en las otras localidades no se pudo encontrar evidencia significativa para soportar la existencia de diferencias entre machos y hembras. El dimorfismo sexual para el tamaño en esta especie ha sido documentado por otros autores como Cannatella y Duellman (1984), en tres poblaciones; sin embargo, como ya se mencionó el tamaño de muestra era pequeño y la proporción de ambos sexos era desigual; Viña *et al.* (2015) reportaron en una población venezolana diferencias altamente significativas entre sexos, con valores promedio de  $25,79 \pm 1,79$  mm para los machos y  $27,73 \pm 1,59$  mm en hembras y un tamaño de muestra adecuado (158 machos y 48 hembras). Para poblaciones del presente trabajo se podría pensar que la ausencia de diferencias significativas en talla entre machos y hembras, obedezcan tal vez a las características intrínsecas de la muestra y no a particularidades de la población, pues como ya se ha mencionado la especie muestra dimorfismo sexual en este aspecto.

#### **Morfometría geométrica:**

Los *partial warps* (variables de la forma) y el tamaño de centroide, como variables propias del análisis de la forma abstrajeron las diferencias existentes entre los individuos de los tres sitios y permitieron reconstruir los principales cambios en los perfiles de la forma del cráneo en organismos adultos.

Recientes trabajos han demostrado que en anfibios, el cráneo es una estructura anatómica importante en el análisis de las variaciones intraespecíficas e interespecíficas de la forma en un contexto ontogénico (Birch, 1999; Ponssa y Candioti, 2012), taxonómico (Fabrezi, 2005; Ivanovic *et al.*, 2011; Acevedo *et al.*, 2016) y ecológico (Adams y Rohlf, 2000; Dayton *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008; Clemente-Carvalho *et al.* 2008). Se ha encontrado que los cambios sustanciales de la forma del cráneo en anuros ocurren después de la metamorfosis (Ponssa y Candioti, 2012); comúnmente se focalizan en la región nasal, donde se dan alargamientos o contracciones, sobre el área posterior del cráneo, la región ótica y del hueso escamoso, a estas dos últimas se les reconocen un rol funcional importante por estar involucradas en el proceso de alimentación, específicamente porque se relacionan con la dinámica de músculos aductores que permiten el movimiento de la mandíbula (Adams y Rohlf, 2000; Ponssa y Candioti, 2012). En general la forma de la cabeza y su configuración ósea, son rasgos en los que se sustentan importantes aportes funcionales en anfibios, principalmente si se considera que estas características y sus variantes determinan aspectos tróficos como el tamaño y tipos de presa que puede ingerir un animal en virtud de la

funcionalidad mandibular en la captura e ingestión de estas (Adams y Rohlf, 2000; Dayton *et al.*, 2005).

Las diferencias de la forma del cráneo de *E. pustulosus*, fueron expresadas por medio de cambios uniformes y no uniformes en la grilla deformable (Figura 11), los hitos 5, 6, 8 y 9 mostraron respuesta antes cambios de tipo no uniforme, lo que se pudo evidenciar debido a que la energía de flexión, produjo irregularidades en la tendencia lineal de la grilla. Los cambios uniformes se evidenciaron en los hitos 1, 2, 3, 7 y 11 que corresponden a zonas intermedias y puntos extremos, es decir la región distal (hitos: 1 y 2) y más proximal del cráneo (hito: 7), estos hitos se asocian con la longitud de la cabeza y se les atribuye el hecho de que puedan existir cabezas más alargadas o achatadas. Los landmarks 1 y 2 además de reflejar variación longitudinal en la forma muestran algo de variación no uniforme debido a que el ángulo del vector de expansión o contracción es levemente agudo para el landmark 1 y obtuso para el 2.

Sin lugar a dudas, una preocupación principal que surge al momento de realizar un estudio con morfometría geométrica, es el tamaño de muestra que se analiza, se ha planteado que tamaños de muestra muy pequeños son inapropiados, ya que en estos casos pueden aumentar la diferencias entre subgrupos llegando a superar incluso hasta más de la mitad de la varianza real y entre más grandes sean las diferencias entre grupos y entre más distanciados estén los taxones más efecto tendrá el tamaño de la muestra sobre la estimación en la varianza (Cardini y Barker, 2015). Cardini y Elton (2007) y Cardini y Barker (2015), sugieren que la variación de la forma puede estimarse adecuadamente en muestras mayores de diez individuos, pues a este tamaño de muestra la varianza inflada (no real) se calcula entre 10 y 20% de la varianza entre grupos, llegando incluso a tan solo 5% con 16 especímenes (Cardini y Barker 2015). Por otro lado, para estimar con exactitud la varianza de tamaño de centroide, estos mismos autores concuerdan en considerar como apropiadas muestras entre 20-40 o más especímenes. En el presente trabajo, se analizó un tamaño de muestra de 30 especímenes por cada localidad, lo cual permite evaluar de manera adecuada las diferencias existentes, tanto en el tamaño como en la forma, generando con esto, bajos porcentajes de error de muestreo y aumentando la precisión en la estimación de diferencias entre las localidades. Las comparaciones entre sexos realizadas en cada localidad, tenían tamaños de muestra máximos de 19 individuos y un mínimo en la localidad de Santa Inés de 11 individuos, esto es aceptable para evaluar diferencias en la forma del cráneo entre sexos, es decir las pruebas aplicadas basadas en las distancias Procrustes (Goodall-F), pero generaría algo de incertidumbre en la estimación de la varianza del tamaño de centroide, considerando los supuestos de Cardini y Elton (2007) y Cardini y Barker (2015), sin embargo tales diferencias en el presente estudio no

fueron significativas y son soportadas además por los resultados obtenidos con el uso de medidas morfométricas.

En el presente trabajo ambas técnicas morfométricas fueron eficientes en el análisis de las diferencias intraespecíficas en *E. pustulosus*, mostrando mediante estadísticos multivariados y univariados las diferencias existentes entre los subgrupos definidos *a priori*; las variables de forma y tamaño, constituyeron rasgos fenotípicos plásticos entre las poblaciones evaluadas. Al comparar los porcentajes de reclasificación correcta obtenidos en el CVA, con el uso de la técnica tradicional y la geométrica, se observa que la diferenciación entre los grupos es más clara cuando se analiza información de la forma, frente a la reconstrucción dimensional que se logra con el análisis multivariado de las diez medidas morfométricas (Tabla 2). En estudios donde se hace uso ambas técnicas se ha encontrado que el nuevo enfoque basado en las formas biológicas, resulta más efectivo en los análisis de las diferencias a nivel intra e interespecífico (Vieira *et al.* 2008; Moreno *et al.*, 2013; Schmieder *et al.*, 2015) un ejemplo de ello es el trabajo de Moreno *et al.*, (2013) donde aplicaron ambas técnicas para estudiar la variación morfométrica de seis subespecies de la lagartija *Phrinosoma orbiculares* y encontraron que la morfometría tradicional no permite separar las subespecies en grupos distintos, mientras que con el análisis de la forma del cráneo pudieron diferenciar tres de estas subespecies. En el estudio de diferencias morfométricas en anuros, Vieira *et al.* (2008), hace uso de ambas técnicas, la morfometría geométrica logró soportar las diferencias existentes entre dos morfotipos de *Proceratophrys cristiceps*, pero la técnica tradicional basada en medidas lineales no mostró resultados muy claros, pues de las 9 medidas morfométricas usadas solo una de ellas (distancia ojo-narina, END) mostró diferencias significativas, cuatro de las medidas tomadas por estos autores se relacionaban con las dimensiones y perfiles de la cabeza, aun así las diferencias fueron notorias a nivel de la END.

**Dieta:** *Engystomops pustulosus* es una especie que presenta forrajeo activo y que se especializa en el consumo de termitas, el presente trabajo aporta evidencias de esta tendencia al menos en dos de las tres localidades evaluadas (Colosó y El Roble), en las cuales esta categoría de presa fue la que tuvo siempre mayor representatividad en la dieta de la especie, con valores calculados del índice de importancia de categorías de presa (IPS) superiores a 80%; los individuos de la localidad de Santa Inés mostraron tendencia al consumo de termitas y de hormigas conjuntamente como presas con alta frecuencia de ingesta; otros trabajos han reportado que la especie es realmente especialista en el consumo de termitas y los resultados de esos autores han justificado esta conducta a nivel espacial y temporal (Blanco-Torres, 2009; Viña *et al.*, 2015; Ryan, 1985, González-Durán *et al.*, 2012), lo que indicaría que la especie busca activamente su presa sin importar la época

del año o el hábitat en que se encuentre (Toft, 1980; Blanco-Torres, 2009). Las hormigas mostraron una importancia relativamente alta y similar a la de las termitas en la dieta de los individuos de Santa Inés, los dos tipos de ítems son muy comunes a nivel del suelo (Bustos y Ulloa-Chacón, 1997; Fittkau y Klinge, 1973; Abadía *et al.*, 2013). En el presente trabajo se observó que en los individuos de El Roble, las termitas representaron un 99,72% del volumen total de las presas encontradas en los estómagos, este valor extremadamente alto puede ser explicado por una alta especialidad o por una abundancia de termitas en el microhábitat; las termitas se encuentran comúnmente en suelos abiertos y pastos bajos, a nivel del suelo entre grietas y huecos, donde pasan a ser un recurso alimenticio importante (Scheffrahn, 2010). Viña *et al.* (2015), reportaron en una localidad en Venezuela valores porcentuales de 92,81% del volumen de la dieta, de igual forma González-Durán *et al.* (2012), encontraron en una población colombiana (Caldas) de *E. pustulosus*, que las Termitas representaban un 96.50% de volumen total, mientras que Blanco-Torres (2009) en las tierras bajas del Caribe Colombiano, reportó un 73,14%, estos valores están por debajo de los que se muestran en el presente trabajo (Tabla 5, 6 y 7) donde para Colosó las termitas representaron un 96,82% del volumen total lo que supera lo reportado por Viña *et al.* (2015). Esto ha sido reportado de igual forma para otras especies filogenéticamente cercanas como *Physalaemus freibergi* y *P. petersi*, en las cuales el consumo de termitas constituyen más del 99% en composición numérica y volumétrica en la dieta de estas especies (Duellman, 1978; Parmelee, 1999; Menéndez-Guerrero, 2001). En Santa Inés hubo predominio volumétrico de la familia Termitidae, pero numéricamente el valor es muy cercano al registrado para Formicidae, más aún el Índice de Importancia de presas no mostró un diferencial muy alto entre estas dos categorías, ubicándolas como las de mayor importancia seguidas por los ácaros.

El predominio numérico y/o volumétrico de termitas, hormigas y ácaros en la dieta de *E. pustulosus*, se ha reportado en anteriores trabajos (Blanco-Torres, 2009; Viña *et al.*, 2015; Ryan, 1985, González-Durán *et al.*, 2012) siendo la de mayor importancia Termitidae; como bien se ha mencionado, se cree que estos tres tipos ítems son fundamentales en la dieta de *Engystomops pustulosus*, no obstante algunos autores consideran a los ácaros como presas accidentales en la dieta de los anuros (Eickwort, 1990; Hölldobler y Wilson, 1990) y que son ingeridos debido a su relación con los insectos sociales; se cree que el poco aporte volumétrico de este tipo presas, implicaría el consumo de grandes cantidades de ácaros para suplir los requerimientos energéticos del depredador, en concordancia con esto se han observado altos valores en dominancia numérica de esta categoría en el presente trabajo; además cerca de 5 estómagos revisados tenían ácaros como única categoría de presa, el mayor registro numérico se tomó en la localidad de Colosó con un macho que contenía 91 ácaros como único tipo de ítem ingerido, lo puede

sugerir que realmente los ácaros no son presas ingeridas de forma accidental. En otras especies de anuros, los ácaros son ingeridos con mucha frecuencia e incluso llegan a aportar valores porcentuales importantes al volumen total de la dieta (González-Durán *et al.*, 2012; Da Rosa *et al.*, 2002; Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007). González-Durán *et al.* (2012), reportaron altos porcentajes de ácaros en la dieta de *E. pustulosus* (%N= 9,6), lo que concuerda con lo encontrado en el presente trabajo, más aún, en especies como *Scinax rostratus* (%N= 75,47) y *Physalaemus gracilis* (%N=15,9), en las que el consumo de ácaros es muy frecuente en relación con otros tipos de presa (Muñoz-Guerrero *et al.*, 2007; Da Rosa *et al.*, 2002).

Las diversidades de la dieta registradas para las tres localidades se consideran bajas con relación a las reportadas en otros trabajos, en los cuales el espectro alimenticio de la especie incluye un mayor número de categorías de presa (González-Durán *et al.*, 2012; Viña *et al.*, 2015).

La dieta de los individuos en las tres localidades evaluadas en el presente trabajo muestra diferencias en composición y abundancia, como lo demuestra el índice de similitud de Morisita-Horn que asocia a las localidades de Colosó y El Roble, donde la dieta es más especializada en el consumo de termitas, mientras que en Santa Inés la especie puede llegar a consumir muchas más presas (Tabla 5), aunque siempre ingiriendo de unas categorías de presa en mayor proporción que otras, siendo en este caso termitas y hormigas que tuvieron valores del índice de importancia relativa de 53,76% y 38,24%, respectivamente, estas dos categorías representan más del 92% de volumen total de la dieta en esta localidad. El índice de índice Jaccard, que mostró resultados contrastantes, no será discutido en mayor profundidad, y por el contrario será utilizado de manera ilustrativa en los resultados, debido a que este solo considera datos de ausencia-presencia y sus resultados en este estudio no se soportaron en otras pruebas como el índice de Shannon o el PLS lo que sí ocurrió para el índice de Morisita-Horn, que incluye datos de frecuencia de categorías de presa, por lo que puede ser mucho más predictivo (Krasnov *et al.*, 2005).

Las diferencias en composición de la dieta de la especie, es decir en el número y tipos de presas ingeridas en cada localidad, podrían obedecer a la oferta diferencial de recursos en los tres sitios muestreados; se cree que *Engystomops pustulosus* puede modificar sus hábitos alimenticios en respuesta a cambios en la oferta ambiental de algún recurso de importancia en su dieta, autores como Da Rosa *et al.* (2002) consideran que el comportamiento trófico de algunas especies de anuros puede mostrar cierto grado de plasticidad y que por tanto no se puede considerar a las especies generalistas o especialistas en un sentido estricto, ya que en algunos casos pueden comportarse de una u otra manera según sea la disponibilidad del recurso. Se ha planteado que diversos factores pueden afectar la conducta de forrajeo de los individuos en una población, algunos de estos son: la disponibilidad

de presas, riesgo de depredación, competencia o la misma estructura del hábitat (Perry y Pianka, 1997).

### **Relación entre morfometría de individuos y su dieta:**

No se obtuvo correlación entre las variables morfométricas LRC, AC y tamaño de centroide con las características de la presa como son longitud, ancho y volumen de presa, ni tampoco con el número de individuos por estómago y el volumen total de contenido estomacal, es decir que las características de la dieta no tienen ninguna influencia lineal del tamaño del depredador, *E. pustulosus*, como ha sido planteado por otros autores, no muestra esta relación entre el tamaño de la presa/ tamaño del depredador, debido a que el tamaño promedio del tipo de presas en las cuales se especializa (Termitidae, Longitud= 4,19 mm  $\pm$  0,46 ; Volumen= 3,88 mm<sup>3</sup>  $\pm$  0,89) (Formicidae, L= 2,77 mm  $\pm$  1,39; V= 1,14 mm<sup>3</sup>  $\pm$  2,05) no supera el tamaño máximo que puede ingerir, en función de las características morfométricas de su boca y perfiles corporales, lo cual incluso le permite consumir presas de mayor tamaño como se encontró en el presente trabajo con coleópteros de la Familia Curculionidae con un volumen corporal de 5,18 mm<sup>3</sup>, que a diferencia de las termitas son de cuerpo duro cubierto de quitina, lo cual sumado a sus dimensiones puede representar un mayor costo energético durante la captura, ingestión y digestión por parte de los anuros (Blanco-Torres, 2009; Viña *et al.*, 2015).

A pesar de que el número de presas encontradas por estómago y el volumen promedio de contenidos estomacales mostró diferencias significativas entre los individuos respecto a las localidades, estas variables no se correlacionaron con el tamaño de los individuos y no respondieron a las diferencias en talla reportadas para *E. pustulosus* en el presente trabajo, así los valores promedio más altos para estas variables se encontraron en los individuos de El Roble, número de presas por estómago= 44,21  $\pm$  40,4mm y volumen del contenido estomacal= 184,95 mm<sup>3</sup>  $\pm$  187,97 y los más bajos en la localidad de Santa Inés, N. ind= 7,45  $\pm$  10,09 Vcont=17,28 mm<sup>3</sup>  $\pm$  42,00. Estas diferencias podrían obedecer a la disponibilidad de recursos en los tres ambientes evaluados y a la calidad del mismo, así en la dieta de los individuos provenientes de El Roble el mayor aporte numérico y volumétrico lo hicieron las termitas, debido principalmente a la abundancia de estos artrópodos a nivel del suelo y a sus hábitos sociales (Scheffrahn, 2010), la conducta de alimentación activa de la especie a su vez aumentan la probabilidad de que ocurran eventos de ingestión masiva de termitas.

### **Covariación variable de la forma y composición de la dieta:**

En el *partial least squares*, la primera dimensión (PSL1) explicó un 99,97% de la covarianza entre los dos bloques de variables, esto es concordante con lo reportado

en el trabajo de Rohlf y Corti (2000), donde se analiza desde una perspectiva más amplia los datos y los resultados reportados en Adams y Rohlf (2000) quienes analizan la relación entre la morfología mandibular de dos especies de salamandras del género *Plethodon* y la dieta de las mismas en una localidad en Pennsylvania, se observa allí que el PLS1, explicó la mayor parte de la varianza (92,8%), mientras que las otras dos dimensiones tuvieron una carga menor a 3% y fueron no significativas, por tal razón se analizó sólo la primera, con esto los autores reportaron la asociación entre la forma de la cabeza y la composición de la dieta en estos anfibios. Los resultados del PLS en el presente estudio indican que existe una correlación entre las variables propias del análisis de la forma y la composición de la dieta de los individuos de los sitios evaluados. Hymenoptera, Acari e Isoptera fueron los ítems que aportaron covariación principalmente al PLS1.

Con un porcentaje de correlación de 64,1% en las dimensiones PLS1 del bloque 1 y 2, se muestra la separación de los individuos de la localidad de Santa Inés del subgrupo Colosó-El Roble (Figura 15); las características morfológicas y la dieta de los individuos provenientes de los tres sitios parecen estar correlacionadas de alguna manera, la separación concuerda con lo encontrado en el índice de similitud de Morisita-Horn, el cual relaciona en base a la composición y abundancia de la dieta a las localidades de Colosó y El Roble y ubica de manera separada a la localidad de Santa Inés, Adams y Rohlf (2000), reportan esta asociación entre dos especies de salamandras, también se documentó en lagartos del género *Sceloporus* de México, en los cuales la forma de la cabeza parece asociarse con la dureza y capacidad de huida de las presas (Galindo-Gil *et al.*, 2015). Aun no existen reportes de este tipo de correlaciones en anfibios a nivel intraespecífico, sin embargo los resultados del presente trabajo, representan datos preliminares de esta tendencia.

## **CONCLUSIONES.**

*Engystomops pustulosus* muestra variación morfométrica a lo largo del rango geográfico evaluado, las variables de forma y las medidas morfométricas expresaron las principales diferencias intraespecíficas.

La especie muestra hábitos alimenticios especialistas en el consumo de termitas; sin embargo puede alimentarse de otros ítems según sea la disponibilidad de recursos en el ambiente.

Los resultados del análisis trófico, nos permiten concluir que no existe asociación entre las características de la presa y los aspectos morfométricos de los individuos, lo que puede ser debido a que el tamaño de la presa en que se especializa la especie, no supera los tamaños de presa máximos registrados en su dieta.

Existe cierto nivel de covariación entre la forma del cráneo y la composición de la dieta, sin embargo los datos se analizaron de forma preliminar; la tendencia especialista de la especie da como resultado poca varianza en el aspecto trófico, por lo que los datos pueden estar influenciados por la abundancia de presa en la dieta y no tanto por la composición.

## **RECOMENDACIONES.**

Se recomienda hacer estudios ecológicos y genéticos que ayuden a entender mejor las causas de la variación en las poblaciones estudiadas en el presente trabajo, de igual forma se puede incluir otras especies relacionadas filogenéticamente para evaluar, si se da en estas un patrón similar y así determinar si efectivamente están sometidas a la misma presión selectiva.

Como lo planteó Liam Revell (com. Pers, 2016), la metodología de huerto común nos podría dar luz, sobre si las causas de la diferenciación son genéticas o se asocian más con adaptaciones locales al ambiente. Esto sería posible por medio de un estudio de desarrollo con larvas de la especie bajo condiciones similares en laboratorio, donde se determine la tasa de crecimiento y tamaño de metamorfosis con renacuajos provenientes de los tres sitios de muestreo; en ese caso, diferencias en tamaño y tasa de desarrollo entre localidades, indicarían que las diferencias observadas podrían ser genéticas, mientras que similaridad en estos aspectos indicaría que las diferencias tal vez obedecen a plasticidad fenotípica expresada durante el desarrollo, lo que podría causar también diferencias en el tamaño de adultez, como las observadas en estudios morfométricos.

De igual forma sería interesante evaluar si la variación morfológica encontrada en el presente trabajo tiene alguna relación con aspectos genéticos, mediante estudios de genética de poblaciones, en los que se evalúe lo reportado por Lampert *et al.* (2003) donde la especie muestra estructuración genética y diferencias alélicas a nivel local que puedan ser asociadas más fácilmente con los cambios morfológicos.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Abadía, J. C., Arcila, Á. M., y Chacón, P. (2013). Incidencia y distribución de termitas (Isoptera) en cultivos de cítricos de la costa Caribe de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 1-8.
- Acevedo, A., Lampo, M., y Cipriani, R. (2016). The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species. *Zootaxa* 4103 (6): 574-586.
- Acosta-Galvis, A. R. (2012). Anfibios de los enclaves secos del área de influencia de los Montes de María y la ciénaga de La Caimanera en el Departamento de Sucre. *Revista Biota Colombiana*, 13(2):211-231.
- Adams D. C., Rohlf F. J., y D. E. Slice. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5-16.
- Adams D. y J. Church. 2007. Amphibians do not follow Bergmann's Rule. *Evolution* 62 (2): 413–420.
- Adams, D. C., y Rohlf, F. J. (2000). Ecological character displacement in *Plethodon*: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A. 97:4106-4111.
- Aguilera, M. (2005). *La economía del departamento de Sucre: Ganadería y sector público*. Documentos de trabajo sobre economía regional. Bogotá: Banco de la República, 1-129.
- Amor, N., Farjallah, S., Ben-Yacoub, S., Paolo M., y Said, K. (2011). Morphological Variation of the African Green Toad, *Bufo boulengeri* (Amphibia: Anura) in Tunisia. *Pakistan J. Zool.*, vol. 43(5), pp. 921-926.
- Amor, N., Farjallah, S., y Said, K. (2009). Morphometric Variation in the Tunisian Green Frog, *Rana saharica* (Anura: Ranidae). *African Zoology*, 44(2), 194–203.
- Armijos-Ojeda, D. (2012). Influencia de la temperatura sobre el tamaño y forma de los anuros en un gradiente altitudinal de las estribaciones orientales de los Andes. Master's thesis, La Habana, Universidad de La Habana.
- Ashton, K. (2002). Do amphibians follow Bergmann's rule? *Can. J. Zool.* 80: 708-716.
- Ashton, K. G., Tracy, M. C., y Queiroz, A. (2000). Is Bergmann's rule valid for mammals? *American Naturalist*, 156:390–415.
- Ashton, K. G., y Feldman, C. R. (2003). Bergmann's rule in nonavian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution*, 57:1151–1163.

- Ashton, K.G. (2002). Do amphibians follow Bergmann's rule? *Canadian Journal of Zoology*, 80:708–716.
- Atkinson, D. (1994). Temperature and organism size a biological law for ectothermes? *Adv. Ecol. Res.*, 156: 390-415.
- Atkinson, D., (1996). Ectotherm life–history responses to developmental temperature. *Animals and Temperature. Phenotypic and Evolutionary Adaptation: 183– 204* (I. A. Johnston & A. F. Benett, Eds.). Cambridge Univ. Press.
- Baraquet, M., Grenat, P.R., Salas, N. E., y Martino, A. L. (2012). Variación morfométrica y geográfica entre poblaciones de *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) en Argentina. *Cuadernos de Investigación UNED*, (ISSN: 1659-4266) Vol. 4(2).
- Barreto, N. L., Caramaschi, U., y Gonçalves, C. A. C. (2005). Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix*. *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro*, 63(2) pag.297-320.
- Barrios-Paternina, E., y Mercado-Gómez, J. (2014). (Caracterización de Santa Inés) Plantas útiles del corregimiento Santa Inés y la vereda San Felipe (San Marcos, Sucre, Colombia). *Revista Ciencia en Desarrollo*, 5(2), 131-144.
- Bechara, W., y Liria, J. (2012). Morfometría geométrica en cinco especies de Buthidae y Scorpionidae (Arachnida: Scorpiones) de Venezuela. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83: 421-431.
- Bernal, M., y Clavijo, J. (2009). An essay on precision in morphometric measurements in anurans: inter-individual, intra-individual and temporal comparisons. *Zootaxa*, 2246: 32–44.
- Bernal-González, V. A., Rangel-Ch, J. O., y Carvajal-Cogollo, J. E. (2014). *Respuesta de los ensamblajes de anfibios y reptiles a los cambios en la cobertura del suelo, en localidades del departamento del Cesar-Colombia*. Posgrado en Ciencias-Biología: Línea Biodiversidad y Conservación, tesis para optar al título de Magíster, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Biavati, G., Wiederhecker, H., y Colli, G. (2004). Diet of *Epipedobates flavopictus* (Anura: Dendrobatidae) in a Neotropical Savanna. *Journal of Herpetology*, 38: 510-518.
- Bidau, C. J., Martí, D. A., & Baldo, D. (2011). Inter-and intraspecific geographic variation of body size in South American redbelly toads of the genus *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 45(1), 66-74.
- Birch, J. (1999). Skull Allometry in the Marine Toad, *Bufo marinus*. *J. Morphol.* 241:115–126.
- Blanco-Torres, A. (2009). *Repartición de microhábitas y recursos tróficos entre especies de bufonidae y leuperidae (amfibios: anura) en áreas con bosque seco tropical de la región caribe, Colombia*. Tesis presentada para optar el título de

Maestría en Biología. Bogotá, Universidad nacional de Colombia, Facultad de ciencias departamento de biología.

Blouin, M. S., y Brown, S. T. (2000). Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, 125(3), 358–361.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology*. Cambridge, Cambridge University Press.

Bookstein, F. L. (1997). Landmark methods for forms without landmarks: Morphometrics of group differences in outline shape. *Med. Image Anal.*, 1(3):225-43.

Bustos, J. H., y Ulloa-Chacón, P. (1997). Mirmeeofauna y perturbación en un bosque de niebla neotropical (Reserva Natural Hato Viejo, Valle del Cauca, Colombia). *Rev. Biol. Trop.*, 45(1): 259-266.

Calle, D. A., Quiñones, M. L., Erazo, H. F., y Jaramillo, N. (2008). Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (Nyssorhynchus) presentes en Colombia. *Biomédica* 28:371-85.

Campo, J. G. (1995). Variación altitudinal y dimorfismo sexual en la coloración y biometría del tritón pirenaico (*Euproctus asper*, Amphibia-Salamandridae). Lucas Mallada. *Revista de Ciencias*, (7), 213-225.

Cannatella, D. C., y Duellman, W. E. (1984). Leptodactylid Frogs of the *Physalaemus pustulosus* Group. *Copeia*, (4): 902-921.

Carvajal-Cogollo, J. E. (2014). *Evaluación a múltiples escalas de los efectos de la transformación del paisaje sobre los ensamblajes de Reptiles en localidades de la región Caribe de Colombia*. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología - Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Pp 120.

Castellano, S., Giacoma, C., y Dujsebayeva, T. (2000). Morphometrical and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 70:341-360.

Cazorla, D., y Acosta, M. (2003). Multivariate Morphometric Discrimination among Three Species of *Lutzomyia* subgenus *Micropygomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 40(6):750-754.

Clemente-Carvalho, R.B.G., Monteiro, L.R.; Bonato, V., Rocha, H.S., Pereira, G.R.; Oliveira, D.F., Lopes, R.T., Haddad, C.F.B.; Martins, E.G., Y Dos Reis, S.F. (2008). Geographic variation in cranial shape in the pumpkin toadlet (*Brachycephalus ephippium*): a geometric analysis. *Journal of Herpetology*. 42: 176-185.

Cortés, G. Á. M., Ramírez, P. M., y Urbina, N. (2015). Protocolo para la medición de rasgos funcionales en anfibios. pp 126-178. En: Salgado-Negret, B. (ed). *La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia. 236 pp.

Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A

review and prospectus. *Biological conservation*, 128 (231) –240.

Cvetkovic D., N. Tomasevic, G. Ficetola, J. Crnobrnja-Isailovic y C. Miaud. 2008. Bergman's rule in amphibians: combining demographic and ecological parameters Cvetkovic, D., Tomasevic, N., Ficetola, G. F., Crnobrnja-Isailovic, J., y Miaud, C. (2008). Bergmann's rule in amphibians: combining demographic and ecological parameters to explain body size variation among populations in the common toad Bufo. *J Zool Syst Evol Res* doi: 10.1111/j.1439-0469.2008.00504.x.

Da Rosa, I., Canavero, A., Maneyro, R., Naya, D. E., Camargo, A. (2002). Diet of Davis, M.A., Douglas, M.R., Collyer, M.L., y Douglas, M.E. (2016). Deconstructing a Species-Complex: Geometric Morphometric and Molecular Analyses Define Species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLoS ONE* 11(1): e0146166. doi:10.1371/journal.pone.0146166.

Dayton G., D. Saenz, K. Baum, R. Langerhans y T. DeWitt. (2005). Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos* 111: 582-591.

Downie, J. R. (1988). Function of the foam in the foam-nesting leptodactylid *Physalaemus pustulosus*. *Herpetological Journal*, 1: 302-307.

Driscoll, D. A. (1998). Genetic structure of the frogs *Geocrinia lutea* and *Geocrinia rosea* reflects extreme population divergence and range changes, not dispersal barriers. *Evolution*, 52(4), 1147-1157.

Duellman, W. E. (1978). *The Biology of an Equatorial Herpetofauna in Amazonian Ecuador*. Miscellaneous Publications of the Museum of Natural History, University of Kansas, 65: 1-352.

Duellman, W.E., y Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Londres.

Dunham, A. (1983). Realized niche overlap, resource abundance and intensity of interspecific competition, pp. 261-280. In: Huey, R.D., Pianka, E. R., y Schoener, T. W. (Eds.). *Lizard Ecology*. Harvard University Press, Cambridge.

Eickwort, G. C. (1990). Associations of mites with social insects. *Annual Review of Entomology*, 35: 469-488.

Ernst, R, y Rodel, M. (2005). Anthropogenically induced changes of predictability in tropical anuran assemblages. *Ecology*, 86: 3111-3118.

Fabrezi, M. (2005). Morphological evolution of Ceratophryinae (Anura, Neobatrachia). *JZS* 44(2), 153–166.

Faivovich, J., Basso, N. G., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T., Wheeler, W. C., Lavilla, E. O., y Ferraro, D. P. (2012). A phylogenetic analysis of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with comments on the evolution of anuran foam nests. *Cladistics* 28: 460–482.

Fittkau, E. J., y Klinge, H. (1973). On biomass and trophic structure of the central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*, 5: 2-14.

Flynn, D. F. B., Gogol-Prokurat, M., Nogeire, T., Molinari, N., Richers, B. T., Lin, B. B., Simpson, N., Mayfield, M. M., y Declerck, F. (2009). Loss of functional diversity

under land use intensification across multiple taxa. *Ecology letters* 12:22–33.

four sympatric anuran species in a temperate environment. *Boletín de la Sociedad de Biología de Uruguay*, 13: 12-20.

Frost, D. R. 2016. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access: 11 de febrero de 2017). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Galindo- Gil, S., Rodríguez-Romero F.J., Velázquez-Rodríguez, A. S., y Moreno-Barajas R. (2015), Correlaciones Morfológicas entre la Forma de la Cabeza, Dieta y uso de Hábitat de Algunos Sceloporus de México: Un Análisis Cuantitativo. *Int. J. Morphol.*, 33(1):295-300.

Galvan-Guevara, S., Sierra, M. I., Gómez, F. H., De La Ossa, V. J., y Fajardo-Patiño, A. (2009). Biodiversidad en el área de influencia de la estación primates de Colosó, sucre, Colombia. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 1(1).

Galvis L. A. (2009). "Geografía económica del Caribe Continental" *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional*. Banco de la República, Sucursal Cartagena, N° 119.

Gamboa, M., y Arrivillaga, J. (2010). Análisis morfométrico de cuatro especies simpátricas del género *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae). *Limnetica*, 29 (2): 247-256.

García, A. C., Ruiz, C. R. L., Román, V. C., González, M. L., y Lopera, D. X. (2011). Morfología de las especies de *Hyphessobrycon* (Characiformes: Characidae), grupo heterorhabdus, en Colombia. *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744), 59 (2): 709-725.

González-Durán, G., Gutiérrez-Cárdenas, P. D. A., y Lasso, S. E. (2012). *Physalaemus pustulosus* (túngara frog) diet. *Herpetological Review*, 43: 124-125.

Green, A. J. (1990). Determinants of chorus participation and the effects of size, weight and competition on advertisement calling in the tungara frog, *Physalaemus pustulosus* (Leptodactylidae). *Anita. Behav.*, 39: 620-638.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., y Ryan, P. D. (2001). PAST version 2.17: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

Hausner, V., Yoccoz, N., y Ims, R. (2003). Selecting indicator traits for monitoring land use impacts: birds in northern coastal birch forests. *Ecological Applications* 13:999–1012.

Hernández-Camacho, J. I. (1992). Caracterización geográfica de Colombia. Páginas 43-51. En: G. Halfter (ed.). *La diversidad biológica de Iberoamérica I*. Acta Zoológica Mexicana. Volumen Especial, México.

Herpetological Animal Care and use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists (2004) *Guidelines for use of live amphibians and*

- reptiles in field and laboratory research*. 41 p.
- Hölldobler, B., y Wilson, E. D. (1990). *The Ants*. The Belknap Press of Harvard University, Cambridge.
- Hoyos, M. A., Otero, R., Saldarriaga, M., y Jaramillo, N. (2003). Divergencia Morfométrica entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). *Actual Biol.*, 25 (79): 157-165.
- Hutcheson, K. (1970). A test for comparing diversities based on the Shannon formula *Journal of Theoretical Biology*, 29 (1970), pp. 151-154.
- Iturra-Cid, M., Ortiz, J. C., & Ibargüengoytía, N. R. (2010). Age, size, and growth of the Chilean frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae): latitudinal and altitudinal effects. *Copeia*, 2010(4), 609-617.
- Ivanovic A., K. Sotiropoulos, U. Nazan, G. Dzukic, K. Olgun, D. Coga y M. Kalezic. (2011). A phylogenetic view on skull size and shape variation in the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*, Caudata: Salamandridae). *Zool. Syst. Evol.* 1:4. 1439-0469.
- Kaiser, H.F. (1960). The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 141-151.
- Kaliontzopoulou, A. (2011). Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation in amphibians and reptiles. *Basic and Applied Herpetology*, 25, 5–32.
- Kendall, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Adv. Appl. Prob.*, 9:428-30.
- King, H. D. (1910). Temperature as a Factor in the Determination of Sex in amphibians. *Biological bulletin*, 18 (3): 131-137.
- Klingenberg, C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour.* 11: 353–357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x PMID: 21429143.
- Klingenberg, C.P. (2013). Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1): 15-24.
- Krasnov, B. R., Shenbrot, G. I., Mouillot, D., Khokhlova, I. S., y Poulin, R. (2005). Spatial variation in species diversity and composition of flea assemblages in small mammalian hosts: geographical distance or faunal similarity?: Spatial variation in diversity of flea assemblages. *Journal of Biogeography*, 32(4), 633–644.
- Lampert, K; Rand, S.; Mueller, U., y M. J. Ryan. (2003). Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology*, 12: 3325–3334.
- Larson, M. P. (2002). Chondrocranial Development in Larval *Rana sylvatica* (Anura: Ranidae): Morphometric Analysis of Cranial Allometry and Ontogenetic Shape Change. *Journal of Morphology* 252:131–144.
- Linares, O.J. (1998). *Mamíferos de Venezuela*. Sociedad Audobon de Venezuela,

Caracas, Venezuela. 691 pp.

Loman, J. (1999). Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia*, 20: 421–430.

López, G. A. (2015). Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biología. Nota, *Temas de Ciencia y Tecnología*, 19 (55):53 – 59.

Luck, G. W., Carter, A., y Smallbone, L. (2013). Changes in bird functional diversity across multiple land uses: interpretations of functional redundancy depend on functional group identity. *PloS one* 8:e63671.

Marcus, L. F. (1990). Traditional morphometrics. En: Rohlf, F. J., y Bookstein, F. L. (Eds). *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Special Publication Number 2. Ann Arbor, Michigan, The University of Michigan Museum of Zoology, pp.77-122.

Marín, F. L. F. (2010). *Variación morfológica e na estrutura do canto em Scinax granulatus (Peters, 1871) (Anura, Hylidae)*. Trabajo presentado para obtener título de máster en biología animal, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre.

Marsh, D.M., Rand, A.S., y Ryan, M.J. (2000). Effects of inter-pond distance on the breeding ecology of túngara frogs. *Oecologia*, 122, 505–513.

Menéndez-Guerrero, P. A. (2001). *Ecología trófica de la comunidad de anuros del Parque Nacional Yasuní en la Amazonía Ecuatoriana*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. 173 pp.

Miyamoto, M.M. (1982). Vertical Habitat Use by Eleutherodactylis Frogs (Leptodactylidae) at two Costa Rican Localities. *Biotropica* 14(2):141-144.

Moreno, B. R, Rodríguez, F., Velázquez, R. A., y Aragón, A. M. (2013). Variación geográfica en *Phrynosoma orbiculare* (Sauria: Phrynosomatidae): Análisis de las Subespecies. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1): 129-143.

Moreno-Fonseca, C. J., y Amat-García, G. D. (2016). Morfoecología de gremios en escarabajos (Coleoptera: Passalidae) en un gradiente altitudinal en robledales de la Cordillera Oriental, Colombia. *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 64 (1): 305-319.

Morrison, C., y Hero, J. M. (2003). Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology*, 72(2), 270–279.

Muñoz-Guerrero, J., Serrano H., Ramírez, P.M. (2007). Uso de microhabitat, dieta y tiempo de actividad en cuatro especies simpátricas de ranas hylidas neotropicales (anura hylidae). *Caldasia*, 29(2):413-425.

Naya, D. E, Bozinovic, F., y Sabat, P. (2008). Ecología nutricional y flexibilidad digestiva en anfibios. En: Vidal, M., y Labra, A. “*Herpetología de Chile*” (eds.). Science Verlag Chile, Santiago, Chile.

Naya, D. E., y Bozinovic, F. (2004). Digestive phenotypic flexibility in post-metamorphic amphibians: studies on a model organism. *Biological Research*, 37: 365-370.

- Oscoz, J., Galicia, D., y Miranda, R. (Editores). (2011). *Identification Guide of Freshwater Macroinvertebrates of Spain*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, ISBN 978-94-007-1553-0.
- Parmelee, J. R. (1999). *Trophic ecology of a tropical anuran assemblage*. Scientific Papers, Natural History Museum, The University of Kansas, 11: 1-59.
- Pedraza, M., y Campos, M. R. (2007). Study of morphological variation of the gonopod of *Strengeriana maniformis* (Brachyura: Pseudothelphusidae) based on the application of geometric morphometry. *Caldasia*, 29(1):143-152.
- Perry, G., y Pianka, E. (1997). Animal foraging: past, present and future. *Trends in Ecology & Evolution* 12:360–364.
- Pizano, C., y García, H. (Editores) (2014). *El Bosque Seco Tropical en Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D.C., Colombia.
- Ponssa, M. L., y Vera, C. F. (2012). Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the *Leptodactylus fuscus* Group (Anura: Leptodactylidae). *Zoomorphology*, 131:349–362.
- Pröhl, H., Ron, S., y Ryan, M. J. (2010). Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American túngara frogs *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10:146.
- Rohlf, F. J. (2015). *tpsUtil, file utility program*, version 1.68. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. 2010. *tpsDig, digitize landmarks and outlines*, version 2.28. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F. J., y Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in ecology and evolution* 8 (4): 129-132.
- Rohlf, J., y M. Corti, (2000), Use of Two-Block Partial Least-Squares to Study Covariation in Shape. *Syst. Biol.*, 49(4):740–753.
- Romero-Martínez, H. J., y Lynch, J. D. (2012). Anfibios de la región Caribe. pp: 677-701 en: Rangel-Ch., J.O. (ed.). 2012. *Colombia Diversidad Biótica XII. La región Caribe de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia-Instituto de Ciencias Naturales. 1046 pp. Bogotá D.C.
- Ron, S. R., Santos, J. C., y Cannatella, D. C. (2006). Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus*) *pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 392-403.
- Rosso, A., Castellano, S., y Giacoma, C. (2004). Ecogeographic analysis of morphological and life-history variation in the Italian frog. *Evol. Ecol. Res.* 18: 303-321.
- Ryan, M. J. (1985). *The Túngara Frog. A Study Sexual Selection and Communication*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Ryan, M.J. (1998) Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex

- differences. *Science*, 181, 1999–2003.
- Ryan, M.J., Rand, A.S., y Weigt, L.A. (1996) Allozyme and advertisement call variation in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution*, 50, 2435–2453.
- Salgado-Negret, B. (ed). 2015. *La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia. 236 pp.
- Sanuy, D., Oromí, N., y Galofré, A. (2008). Effects of temperature on embryonic and larval development and growth in the natterjack toad (*Bufo calamita*) in a semi-arid zone. *Animal Biodiversity and Conservation*, 31(1), 41–46.
- Scheffrahn R. H. (2010). An extraordinary new termite (Isoptera: Termitidae: Syntermitinae: *Rhynchotermes*) from the pasturelands of northern Colombia. *Zootaxa*, 2387: 63–68.
- Schmieder, D. A., Benítez, H. A., Borissov, I. M., y Fruciano, C. (2015). Bat Species Comparisons Based on External Morphology: A Test of Traditional versus Geometric Morphometric Approaches. *PLOS ONE*, 10(5).
- Sequeira, F., Sodr , D., Ferrand, N., Bernardi, J.A., Sampaio, I., Schneider, H., y Vallinoto, M. (2011). Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 1–15.
- Shannon, C. E., y Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 pp.
- Sheets, H. (2004). *Morphometrics software: IMP-Integrated morphometrics package*. <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Silva, D. M., Cruz, A. D., Bastos, R. P., Telles, M. P. C., y Diniz-Filho, J. A. F. (2008). Morphometric and genetic differentiation among populations of *Eupemphix nattereri* (Amphibia, Anura, Leiuperidae) from central Brazil. *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre*, 98(4):493-500.
- Slade, R.W., y Moritz, C. (1998). Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced ranges. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 265, 769–777.
- Smith, D. C., y Van Buskirk, J. (1995). Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. *Am. Nat.*, 154: 211-233.
- Stuart, S. N., Chanson, J.S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., y Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783–1786.
- Tárano, Z. (2010). Advertisement calls and calling habits of frogs from a flooded savanna of Venezuela. *South American Journal of Herpetology*, 5: 221-240.
- Tejedo, M., y Reques, R., (1994). Plasticity in metamorphic traits of natterjack tadpoles: the interactive effects of density and pond duration. *Oikos*, 71: 295–304.
- Thorp, J. H., y Covich, A. P. (2001). *Ecology and Classification of North American*

*Freshwater Invertebrates-Second Edition*. Permissions Department, Harcourt Inc., 6277 Sea Harbor Drive, Orlando, Florida 32887-6777.

to explain body size variation among populations in the common toad *Bufo bufo*. J. Toft, C. A. (1980). Feeding ecology of thirteen syntopic species of anurans in a seasonal tropical environment. *Oecologia*, 45: 131-141.

Toft, C. A. (1985). Resource partitioning in Amphibians and Reptiles. *Copeia*, 1985:1-21.

Toro, I. M. V., Manriquez, S. G., y Suazo, G. I. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *Int. J. Morphol.*, 28(4):977-990.

Tryjanowski, P., Sparks, T., Rybacki, M., y Berger, L. (2006). Is body size of the water frog *Rana esculenta* complex responding to climate change? *Naturwissenschaften*, 93: 110–113.

Urbina-Cardona, J. N., y Reynoso, V. H. (2005). Recambio de anfibios y reptiles en el gradiente potrero-borde-interior en los tuxtlas, veracruz, méxico. Pp. 191–208 in Halffter, G., Soberón, J., Melic, A. & Koleff, P. (eds.). *Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma*. Monografías Tercer Milenio, Zaragoza, España.

Vallinoto, M., Sequeira, F., Sodré, D., Bernardi, J.A.R., Sampaio, I., y Schneider, H. (2010). Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. *Zoologica Scripta*, 39, 128–140.

Vences, M., Galán, P., Vieites, D.R., Puente, M., Oetter, K., y Wanke S. (2002). Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation. *Ann. Zool. Fennici*, 39: 209-220.

Vieira, K.S., Arzabe, C., Hernández, M., y Vieira, W. S. (2008). An examination of morphometric variations in a neotropical toad population (*Proceratophrys cristiceps*, Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *PLoS ONE* 3: 39.

Viña, A. J. L. (2015). *Caracterización de la dieta de Engystomops pustulosus (Anura: Leptodactylidae) durante la época reproductiva en la Hacienda La Gu quira, Estado Yaracuy, Venezuela*. Universidad Central de Venezuela, requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

Vitt, L. J., y Caldwell, J. P. (2014). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic Press Elsevier. London, United Kingdom.

Zaragoza, T. C. (2013). *Variación fenotípica en el género Calotriton (Dug s, 1852)*. Tesis de fin de máster, Universidad Autónoma de Madrid.

Zelditch M., Swiderski D. L., Sheets H. D., y W. L. Fink. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Boston: Elsevier Academic Press. 444 pp. *Zool. Syst. Evol. Res.* doi: 10.1111.

Zornosa, T. C. (2011). *Relación entre el tamaño corporal y los estados de madurez sexual en Dendropsophus columbianus (Anura, Hylidae) colectados en la cuenca*



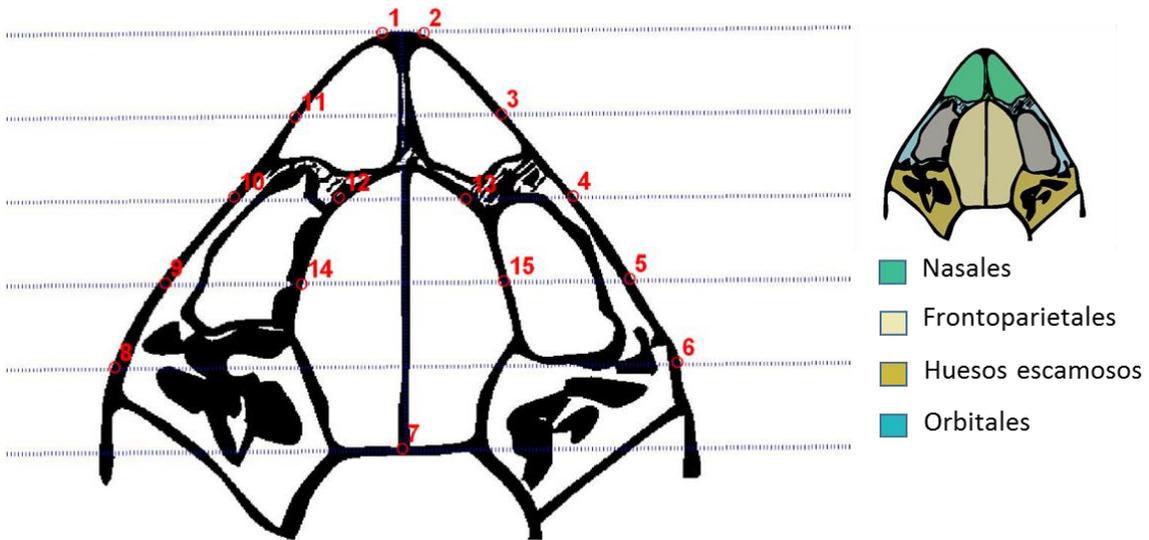

**Anexo 2.** Fotografía de los hábitats predominantes en los sitios de muestreo **A.** Montes de María localidad de Colosó, bosque seco tropical **B.** Municipio de El Roble área abierta y pastizal inundable **C.** Cuerpo de agua (jagüey) en finca de la localidad de Santa Inés.



**Anexo 3.** Autor de este trabajo durante la obtención de datos primarios para el análisis con morfometría geométrica y de dieta de la especie.



**Anexo 4.** Posición anatómica de los landmarks sobre la región dorsal del cráneo de los especímenes.



**Anexos de resultado y discusión:**

**Anexo 5.** Estadísticas descriptivas en base a las medidas morfométricas tomas en individuos machos y hembras de las tres localidades, se muestra la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos.

Medidas	Machos					Hembras				
	Loc.	Media	Des. Est	Míni	Máxi	Loc.	Media	Des. Est	Míni	Máx
<b>LRC</b>	Colosó	30,65	1,30	29,03	33,65	Colosó	35,01	1,30	31,67	36,73
	El Roble	26,80	1,77	24,14	29,57	El Roble	28,15	3,70	21,40	32,86
	Santa Ines	24,61	,96	22,35	26,04	Santa Ines	25,77	2,29	22,57	29,37
<b>AC</b>	Colosó	8,95	,34	8,36	9,57	Colosó	9,39	,50	8,52	9,95
	El Roble	7,35	,58	6,43	8,41	El Roble	7,62	,89	6,14	8,83
	Santa Ines	7,12	,34	6,59	7,86	Santa Ines	7,17	,85	5,94	8,67
<b>DI</b>	Colosó	1,87	,16	1,51	2,15	Colosó	1,97	,24	1,62	2,28
	El Roble	1,61	,14	1,31	1,83	El Roble	1,59	,21	1,25	1,93
	Santa Ines	1,71	,20	1,36	1,99	Santa Ines	1,63	,29	1,17	2,02
<b>DON</b>	Colosó	4,61	,53	3,88	5,42	Colosó	4,89	,46	4,17	5,50
	El Roble	4,10	,61	3,27	4,97	El Roble	4,20	,43	3,53	4,96
	Santa Ines	3,95	,38	3,24	4,99	Santa Ines	3,87	,62	3,14	4,87
<b>DO</b>	Colosó	2,86	,32	2,43	3,46	Colosó	2,95	,27	2,55	3,50
	El Roble	2,69	,25	2,29	3,23	El Roble	2,72	,45	2,21	3,65
	Santa Ines	2,65	,33	2,01	3,19	Santa Ines	2,47	,44	1,70	3,18
<b>LH</b>	Colosó	7,90	,63	6,50	9,11	Colosó	8,94	,51	8,07	9,88
	El Roble	6,51	,56	5,44	7,08	El Roble	6,94	,94	5,32	8,31
	Santa Ines	6,75	,45	6,22	7,72	Santa Ines	6,71	,66	5,49	7,87
<b>LF</b>	Colosó	12,31	,83	10,95	13,60	Colosó	14,11	1,20	11,60	15,76
	El Roble	11,01	,50	10,23	12,05	El Roble	11,07	,98	9,30	12,32
	Santa Ines	10,63	,72	9,27	11,69	Santa Ines	10,73	1,01	9,23	12,22
<b>LTA</b>	Colosó	14,17	,80	12,63	15,95	Colosó	15,03	,66	13,87	16,31
	El Roble	11,53	,53	10,55	12,31	El Roble	11,60	1,11	9,25	12,66
	Santa Ines	11,23	,69	10,25	12,69	Santa Ines	11,09	1,02	9,66	12,50
<b>LP</b>	Colosó	14,57	,76	12,80	15,50	Colosó	15,26	1,07	13,68	17,70
	El Roble	12,03	,73	11,14	13,41	El Roble	11,97	1,29	9,65	13,48

<b>LA</b>	Santa Ines	11,34	,68	10,25	12,42	Santa Ines	11,04	1,10	9,14	12,98
	Colosó	8,18	,62	6,94	9,11	Colosó	9,03	,36	8,22	9,52
	El Roble	6,42	,36	5,77	6,97	El Roble	6,53	,73	5,08	7,08
	Santa Ines	6,43	,32	5,94	7,13	Santa Ines	6,27	,66	5,16	7,44

**Anexo 6.** Resultados de la prueba t-student realizada entre machos y hembras por localidad, se muestran los valores de t y su respectiva significancia estadística. Con negrita se resaltan valores  $p < 0,05$ .

<b>Medidas</b>	Coloso		El Roble		Santa Inés	
	t	Sign.	t	Sign.	t	Sign.
LRC	-9,1340	<b>,000</b>	-1,1212	,271	-1,8464	,075
AC	-2,7768	<b>,009</b>	-0,8828	,384	-0,0473	,962
DI	-1,2418	,224	0,4445	,660	0,9942	,328
DON	-1,5940	,122	-0,6499	,521	0,6187	,541
DO	-0,8759	,388	-0,0921	,927	1,3620	,184
LH	-4,8596	<b>,000</b>	-1,4338	,162	0,3108	,758
LF	-4,7514	<b>,000</b>	-0,1206	,904	-0,2562	,799
LT	-3,2284	<b>,003</b>	-0,1154	,908	0,5292	,600
LP	-2,0357	,051	0,2813	,780	0,9891	,331
LA	4,4540	<b>,000</b>	-0,4675	,643	0,9891	,312

**Anexo 7.** Resultados del ANOVA realizado entre individuos de las tres localidades, separados según el sexo; se muestran los valores de la suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrados medios, F y su respectiva significancia estadística.

<b>Medidas</b>	Machos					Hembras				
	Sum. Cuad	gl	Cuad. Med.	F	Sign.	Sum. Cuad	gl	Cuad. Med.	F	Sign.
LRC	308,07	2	154,04	81,88	,000	616,92	2	308,46	46,20	,000
AC	31,83	2	15,91	84,18	,000	37,35	2	18,68	33,00	,000
DI	,55	2	,28	9,79	,000	1,25	2	,62	10,23	,000
DON	3,88	2	1,94	7,42	,002	7,22	2	3,61	14,41	,000
DO	,40	2	,20	2,14	<b>,128</b>	1,46	2	,73	4,88	,013
LH	17,57	2	8,79	29,67	,000	41,43	2	20,72	40,24	,000
LF	25,16	2	12,58	26,12	,000	94,86	2	47,43	40,81	,000
LTA	83,61	2	41,81	90,75	,000	125,18	2	62,59	72,18	,000

LP	92,32	2	46,16	88,51	,000	133,00	2	66,50	49,71	,000
LA	32,33	2	16,17	83,22	,000	62,69	2	31,35	91,80	,000

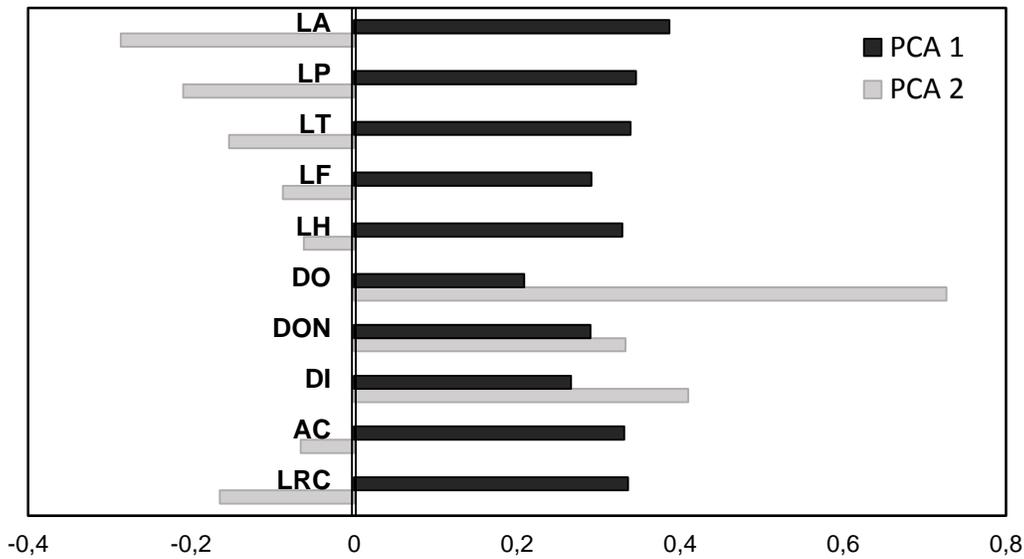
**Anexo 8.** Coeficientes de determinación  $R^2$  calculado de la correlación entre la variable de tamaño LRC y el resto de las medidas morfométricas, para los individuos de cada localidad, en negro se muestran las correlaciones que arrojaron valores de p mayores a 0.05, es decir no significativos.

Medidas/LRC	Colosó	El Roble	Santa Inés
AC	0,232	0,853	0,576
DI	0,025	0,407	0,233
DON	0,045	0,441	0,173
DO	0,028	0,449	0,048
LH	0,334	0,671	0,167
LF	0,450	0,792	0,517
LT	0,501	0,817	0,532
LP	0,206	0,673	0,397
LA	0,495	0,742	0,496

**Anexo 9.** Varianza explicada por cada uno de los componentes principales, del PCA realizado en base a las medidas morfométricas tomadas en individuos de cada localidad.

PC	Eigenvalue	% variance
1	0,0289386	76,819
2	0,00293338	7,7868
3	0,00194135	5,1534
4	0,0013906	3,6914
5	0,000871	2,3121
6	0,00055438	1,4716
7	0,0004209	1,1173
8	0,0002636	0,69975
9	0,00020192	0,536
10	0,00015558	0,41299

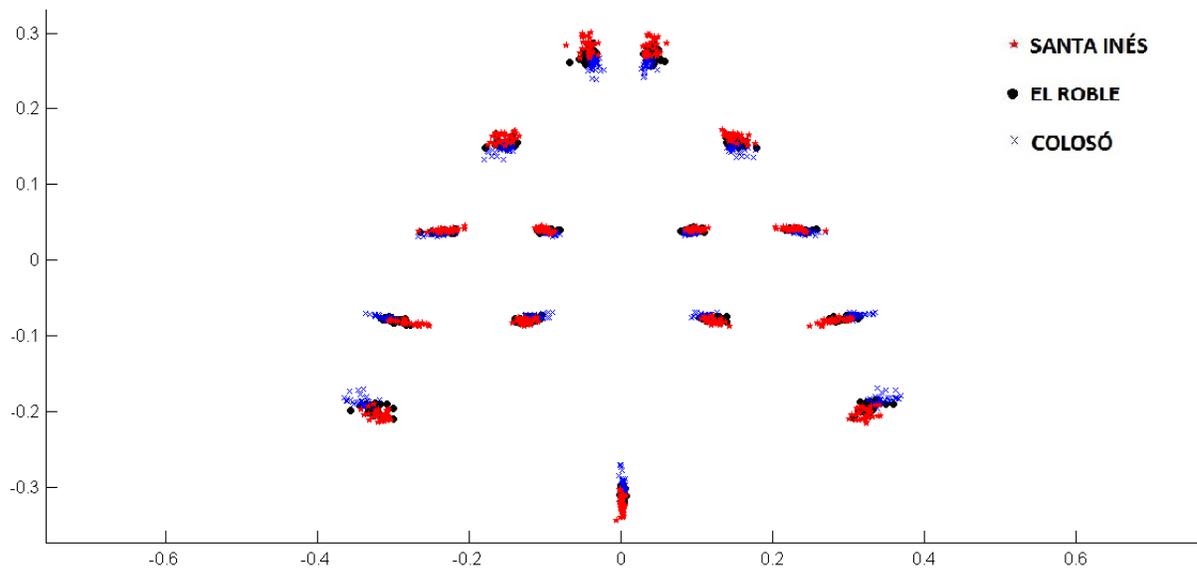
**Anexo 10.** Aportes de varianza a los componentes principales en cada una de las diez medidas morfométricas tomadas en los individuos de las tres localidades.



**Anexo 11.** Porcentajes de reclasificación correcta, resultante del CVA/Manova en base a la matriz de covarianza de las 10 medidas morfométricas tomadas en individuos de las tres localidades.

Subgrupo Reclasificado	Localidades (%)		
	<b>COLOSO</b>	<b>EL ROBLE</b>	<b>SANTA INÉS</b>
COLOSO	<b>96,67</b>	3,33	0,00
EL ROBLE	0,00	<b>83,33</b>	16,67
SANTA INÉS	0,00	10,00	<b>90,00</b>

**Anexo 12.** Análisis generalizado de Procrustes en base a las matrices de morfocoordenadas de los individuos de las tres localidades, La dispersión en torno a cada landmark representa la variación de forma, realizado en el software MorphoJ.



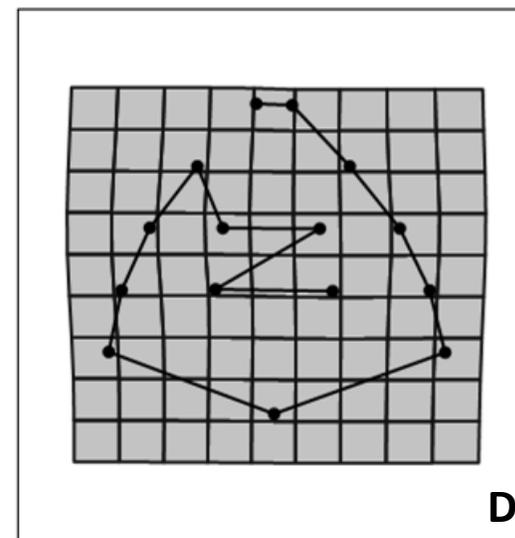
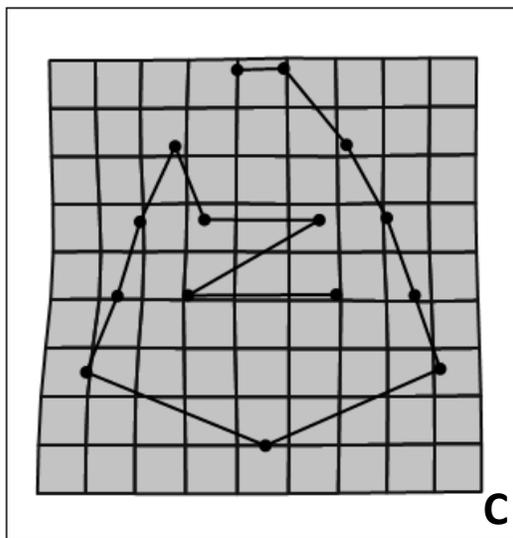
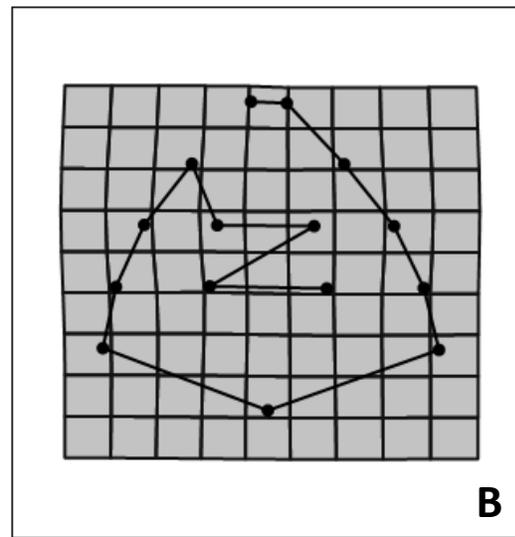
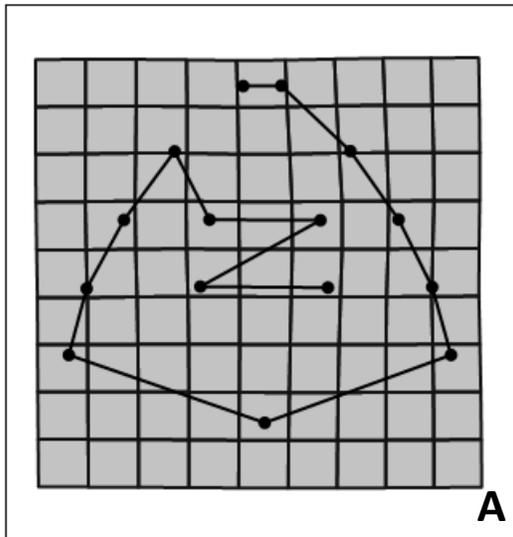
Con el análisis Procrustes se consigue depurar la matriz de morfocoordenadas de los individuos extrayendo variables físicas tales como escala, posición y rotación, debido a que estas no definen la forma de los individuos estudiados y no provee elementos para un análisis morfológico con sentido biológico, lo cual si se puede realizar con la información de la forma pura (Shape).

**Anexo 13.** Varianza explicada por cada uno de los componentes dimensionales extraídos del análisis de componentes principales, de la forma del cráneo de los individuos de cada localidad.

PC	Eigenvalue	% variance
1	0,00206873	65,78
2	0,00053961	17,16
3	0,00014706	4,68
4	8,24E-05	2,62
5	7,81E-05	2,48
6	5,59E-05	1,78
7	4,27E-05	1,36
8	3,00E-05	0,95
9	1,71E-05	0,54
10	1,59E-05	0,50
11	1,41E-05	0,45
12	1,03E-05	0,33

13	8,83E-06	0,28
14	8,09E-06	0,26
15	4,61E-06	0,15
16	3,60E-06	0,11
17	3,16E-06	0,10
18	2,30E-06	0,07
19	2,28E-06	0,07
20	1,95E-06	0,06
21	1,77E-06	0,06
22	1,63E-06	0,05
23	1,41E-06	0,04
24	1,05E-06	0,03
25	1,00E-06	0,03
26	8,63E-07	0,03
27	6,33E-07	0,02
28	4,02E-16	0,00
29	2,96E-16	0,00
30	1,62E-16	0,00

**Anexo 14.** Formas promedio del cráneo de *Engystomops pustulosus*, reconstruidas a partir de las configuraciones de los individuos de **A.** Colosó, **B.** El Roble y **C.** Santa Inés, **D.** Representa una forma consenso.



**Anexo 15.** Porcentajes de reclasificación correcta, resultante del CVA/Manova de las conformaciones de morfocoordenadas del cráneo (en negrita).

Subgrupo Reclasificado	Localidades (%)		
	<b>COLOSÓ</b>	<b>EL ROBLE</b>	<b>SANTA INÉS</b>
COLOSÓ	<b>93,33</b>	0,00	6,67
EL ROBLE	3,33	<b>96,67</b>	0,00
SANTA INÉS	6,67	3,33	<b>90,00</b>

**Anexo 16.** Numero de presas por categoría, encontradas en los estómagos de individuos de las tres localidades (N=90).

Categorías	Santa Inés		Colosó		El Roble	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Formicidae	51	20	1	2	6	4
Staphylinidae	0	2	*	*	*	*
Curculionidae	1	0	*	*	*	*
Scarabaeidae	0	1	*	*	*	*
Larva Coleoptera	1	0	1	0	0	1
Tenebrionidae	0	2	1	0	*	*
Dytiscidae	0	1	1	0	*	*
Termitidae	13	65	261	58	239	550
Acari	17	2	91	8	42	1
Hygrophyla	0	1	0	1	*	*
Psocidae	1	0	*	*	*	*

**Anexo 17.** Coeficientes de determinación  $R^2$  producto de la regresión lineal entre las variables morfométricas de la especie *E. pustulosus* y las características de las presas ingeridas, en negrita las correlaciones que tuvieron valores de p menores a 0,05 (n=61).

Variab Morfométricas	Volumen cont. Est. (mm <sup>3</sup> )	Numero de ítems	longitud (mm)	ancho (mm)	volumen (mm <sup>3</sup> )
LRC	0,014	0,010	<b>0,094</b>	<b>0,087</b>	<b>0,108</b>
AC	0,004	0,008	0,063	<b>0,072</b>	<b>0,088</b>
Tamaño De Centroide	0,023	0,025	<b>0,080</b>	<b>0,074</b>	<b>0,101</b>

**Anexo 18.** Comparación de las variables tróficas en relación con el sexo, en cada localidad. Resultados de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y media, en negrilla se indican valores de  $p < 0,05$ . Variables tróficas, V. Cont. Est.: volumen del contenido estomacal; N. Ítems: Número de ítems; longitud, ancho y volumen de presa.

<b>Colosó</b>					
Sexo/variables tróficas	V. Cont. Est	N. Ítems	longitud	ancho	volumen
U de Mann-Whitney	27,000	27,000	42,500	48,500	49,500
Sig. asintótica (bilateral)	,087	,085	,512	,925	1,000
Media (♂/♀)	110,27/30,69	32,36/7,67	4,15/4,27	1,29/1,30	4,04/4,20

<b>EL Roble</b>					
Sexo/variables tróficas	V. Cont. Est	N. Ítems	longitud	ancho	volumen
U de Mann-Whitney	20,000	18,500	40,000	40,000	40,000
Sig. asintótica (bilateral)	<b>,048</b>	<b>,035</b>	,642	,642	,642
Media (♂/♀)	93,84/310,24	25,64/69,75	4,40/4,14	1,36/1,25	4,28/3,82

<b>Santa Inés</b>					
Sexo/variables tróficas	V. Cont. Est	N. Ítems	longitud	ancho	volumen
U de Mann-Whitney	22,000	39,500	22,500	17,500	16,500
Sig. asintótica (bilateral)	<b>,020</b>	,257	<b>,020</b>	<b>,008</b>	<b>,006</b>
Media (♂/♀)	5,66/37,63	5,36/11,13	2,59/4,05	,70/1,30	1,28/3,71