

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sistemática del complejo de especies de *Hypsiboas cinerascens* (Anura: Hylidae) en la  
Amazonía ecuatoriana

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

DANIELA PAREJA MEJÍA

Quito, 2013

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Daniela Pareja Mejía ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Santiago R. Ron  
Director de la Disertación

Quito, Abril de 2013

*A mi familia.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su inmenso apoyo y cariño. Por darme siempre el aliento que me ha ayudado a salir adelante. A mi hermana Ale por su ayuda infinita y su amor.

A Santiago R. Ron, director de la disertación por sus consejos, su apoyo y enseñanzas a largo de este proyecto. De igual forma, a Omar Torres y Andrés Merino por su apoyo y por las valiosas sugerencias para este trabajo.

Este estudio recibió apoyo económico para salidas de campo y trabajo de laboratorio de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y del proyecto código PIC 08-0470 “Inventario y caracterización genética y morfológica de la diversidad de reptiles, aves y anfibios de los Andes del Ecuador”, financiado por la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

De forma especial quiero agradecer a Teresa Camacho, Daniel Rivadeneira, Eduardo Toral, Italo Tapia, Francy Mora, Mario Yáñez, Fernando Ayala y Diego Paucar por su ayuda en el campo. A Marcel Caminer, Diana Pazmiño, Paloma Lima, Damián Nicolalde, Diana Troya, Paulina Santiana, Pablo Menéndez, Freddy Velásquez y Francy Mora por su ayuda, colaboración y enseñanzas. Al personal QCAZ y a Diana Pazmiño y Andrea Manzano del Laboratorio de Biología Molecular por su colaboración. A Pablo Venegas (CORBIDI) por el préstamo de los tejidos de Perú.

A mis amigos Daphne, Daniel, Alexandra, Daniel A., Bernardo, Charlie, Paloma y Teresa quienes son importantes para mí y han estado dispuestos a darme consejos a lo largo de este proyecto. A mis amigas de toda la vida Fer, Dani, Vero, Kari, Nathi y Andre por apoyarme desde donde quiera que estén o yo esté.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT .....	3
3.	INTRODUCCIÓN.....	5
	3.1. DIVERSIFICACIÓN EN LA AMAZONÍA ECUATORIANA.....	5
	3.2. OBJETO DE ESTUDIO .....	6
	3.2.1.HISTORIA TAXONÓMICA.....	6
	3.2.2.DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	8
	3.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	8
	3.3. OBJETIVOS .....	11
	3.3.1.Generales.....	11
	3.3.2.Específicos .....	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
	4.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS LINAJES DE <i>Hypsiboas cinerascens</i> .....	12
	4.2. MUESTREO POBLACIONAL.....	12
	4.3. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN .....	12
	4.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS .....	13
	4.4.1.MODELOS EVOLUTIVOS PARA LOS ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	14
	4.4.1.1. ESTRATEGIAS DE PARTICIÓN.....	14
	4.4.2.ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA .....	14
	4.4.3.MÁXIMA VEROSIMILITUD .....	15
	4.5. ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA.....	15
	4.6. ANÁLISIS DE BARRERAS GEOGRÁFICAS.....	16
	4.7. CANTOS DE ANUNCIO.....	17

4.8. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS.....	18
5. RESULTADOS .....	19
5.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS .....	19
5.1.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA .....	19
5.1.2. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	20
5.1.3. ESTIMACIONES DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA.....	21
5.2. ESTIMACIÓN DE BARRERAS GEOGRÁFICAS .....	21
5.3. CANTOS DE ANUNCIO.....	22
5.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS.....	23
5.4.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS.....	23
5.4.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS.....	23
6. DISCUSIÓN.....	25
6.1. ANÁLISIS INTEGRATIVO .....	25
6.2. BARRERAS GEOGRÁFICAS Y TIEMPO DE DIVERGENCIA .....	30
6.3. HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS PARA EXPLICAR PATRONES DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA .....	32
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	34
8. LITERATURA CITADA.....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de las localidades muestreadas en este estudio. ....	47
<b>Figura 2.</b> Mapa de localidades de los especímenes secuenciados en este estudio .....	48
<b>Figura 3.</b> Filograma consenso resultante del análisis bajo el criterio de Inferencia Bayesiana de los genes combinados 12S, ND1 y CO1. ....	49
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético producto del análisis de Máxima Verosimilitud para los genes 12S, ND1 y CO1.....	50
<b>Figura 5.</b> Árbol filogenético del Análisis Bayesiano que estima el tiempo de divergencia entre clados.....	51
<b>Figura 6.</b> Mapa resultante del análisis de barreras geográficas.. .....	52
<b>Figura 7.</b> Proyección de las variables acústicas sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales.....	53
<b>Figura 8.</b> Diagrama de caja que compara la longitud rostro cloacal (LRC) en hembras del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> entre los clados A, B y C.. .....	54
<b>Figura 9.</b> Diagrama de caja que compara la longitud rostro cloacal (LRC) en machos del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> entre los diferentes clados.....	55
<b>Figura 10.</b> Fotografías de individuos pertenecientes al Clado A del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> .....	56
<b>Figura 11.</b> Fotografías de individuos pertenecientes al Clado B del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> .. .....	57
<b>Figura 12.</b> Fotografías de individuos pertenecientes al Clado C del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> .. .....	58

**Figura 13.** Fotografías de individuos pertenecientes al Clado D del complejo de especies

*Hypsiboas cinerascens*. ..... 59

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Regiones de ADN y cebadores empleados en este estudio. ....	61
<b>Tabla 2.</b> Descripción de las variables temporales obtenidas del análisis de los cantos de anuncio del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> (en base a Caminer, 2010). ....	62
<b>Tabla 3.</b> Modelos de evolución seleccionados para cada partición en los análisis filogenéticos. ....	63
<b>Tabla 4.</b> Factor Bayes para las diferentes estrategias de partición (EP1, EP2 y EP3). ....	64
<b>Tabla 5.</b> Características de los cantos de anuncio para tres clados del complejo de especies <i>Hypsiboas cinerascens</i> . ....	65
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP). ....	66
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la prueba de t realizada a los componentes principales encontrados en el análisis de componentes principales entre los diferentes clados ....	67
<b>Tabla 8.</b> Estadísticos descriptivos para las medidas, en cm, de la longitud rostro-cloacal de machos y hembras para cada clado. ....	68
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la prueba de comparaciones utilizando la prueba de Wilcoxon para los LRC de machos y hembras entre los diferentes clados. ....	69
<b>Tabla 10.</b> Descripción de caracteres morfológicos cualitativos para los diferentes clados. ....	70

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Lista de individuos colectados durante el estudio y depositados en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....	72
<b>Anexo 2.</b> Protocolos de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes 12S, ND1 y CO1.....	75
<b>Anexo 3.</b> Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guandina.....	77
<b>Anexo 4.</b> Lista de localidades empleadas en el análisis de barreras geográficas.....	79
<b>Anexo 5.</b> Mapa resultante del análisis de barreras geográficas que muestra la triangulación Dealaunay.....	80
<b>Anexo 6.</b> Lista de especímenes secuenciados en este estudio.....	81
<b>Anexo 7.</b> Datos de los individuos utilizados en el análisis de los cantos de anuncio.....	84

## 1. RESUMEN

En la última década, se han desarrollado estudios taxonómicos en la familia Hylidae que integran análisis moleculares, de acústica y morfológicos que han servido para descubrir y describir nuevas especies. En este trabajo se realizó un estudio integrativo con el fin de determinar si *Hypsiboas cinerascens* es un complejo de especies. Se secuenció aproximadamente 3121 pb de genes mitocondriales (12S, ND1 y CO1) de individuos colectados en la Amazonía ecuatoriana y peruana, con el fin de realizar análisis filogenéticos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud. Además, se compararon 16 cantos de anuncio. Adicionalmente, se comparó el tamaño y caracteres morfológicos cualitativos de coloración. Se realizó un análisis de barreras geográficas para identificar la ubicación geográfica de barreras al flujo genético.

Análisis filogenéticos mostraron árboles en los que se identifican cuatro clados con buen soporte: al primer clado (A) pertenecen las poblaciones de la “alta Amazonía”, con altitudes por sobre los 800 metros. El segundo clado (B) contiene poblaciones de la “Amazonía norte”, que corresponde al norte del Río Napo. El clado C está conformado por poblaciones al sur del Río Napo, lo que sería la “Amazonía centro”, además contiene un individuo de Perú (Cordillera de Kampankis). El clado D incluye poblaciones de la “Amazonía sur”, al norte de los ríos Santiago y Zamora. En las filogenias se observó además una separación entre individuos de zonas altas (846 msnm a 1472 msnm) y zonas bajas (187 msnm a 400 msnm), con pocas excepciones. Por otra parte, el análisis de barreras geográficas indica la presencia de una barrera en la Provincia de Morona Santiago. Los cantos de anuncio muestran diferencias entre clados sobre todo en las

frecuencias fundamental y dominante. Existen diferencias morfológicas cualitativas entre clados como la presencia o ausencia de manchas en dorso. Existió mayor diferenciación molecular que morfológica o acústica. En conjunto, los datos sugieren que *Hypsiboas cinerascens* es un complejo de dos especies conformado por cuatro grupos genéticos.

**Palabras clave:** acústica, barreras geográficas, taxonomía integrativa, filogenia, *Hypsiboas cinerascens*, morfología.

## 2. ABSTRACT

In the last decade many taxonomic studies integrating molecular, morphological and acoustic data have helped to discover and describe new species within the Hylidae family. This study provides an integrative analysis to determine if *Hypsiboas cinerascens* is a species complex. Around 3121 bp of mitochondrial genes (12S, ND1 and CO1) of individuals collected in the Ecuadorian and Peruvian Amazon were sequenced in order to carry out phylogenetic analyses under Bayesian and Maximum Likelihood optimality. Sixteen advertisement calls were also compared. In addition, I compared size and qualitative morphological characters of color pattern. I did an analysis of geographic barriers to identify the geographic location of barriers to gene flow.

Phylogenetic analysis revealed four clades with high support: the first clade (A) includes populations of the “high Amazon”, with altitudes above 800 m. The second clade (B) contains populations of the “northern Amazon”, which are north of the Napo River. Clade C consists of populations at the south of the Napo River or “middle Amazon”, and also by a population from Peru (Cordillera de Kampankis). Clade D includes populations of “southern Amazon”, in the north part of the Santiago and Zamora Rivers. In the phylogenies, a separation between highland (846 m to 1472 m) and lowland (187 m to 1472 m) populations is observed, with some exceptions. The geographic barriers analysis indicates the presence of a barrier in the Morona Santiago province. The advertisement calls showed differences between the clades in fundamental and dominant frequencies. There were also morphological qualitative differences like presence or absence of marks in the dorsum. There was more molecular than morphological or acoustic differentiation.

Overall, the data suggest that *Hypsiboas cinerascens* is a species complex with four clades and probably two species.

**Keywords:** advertisement calls, geographic barriers, *Hypsiboas cinerascens*, integrative taxonomy, morphological, phylogeny.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. DIVERSIFICACIÓN EN LA AMAZONÍA ECUATORIANA

Para Wiens *et al.* (2011) es un reto tratar de explicar cómo un gran número de especies coexisten en bosques tropicales lluviosos y el por qué la riqueza local de las especies varía en el mundo. Los patrones de riqueza de especies dependen de los procesos que la influyen directamente como la especiación, la extinción y la dispersión (Wiens *et al.*, 2011). En la actualidad, se utilizan filogenias para explicar patrones estructurales de las comunidades locales (Webb *et al.*, 2002; Cavender-Bares *et al.*, 2009). Además, se han propuesto hipótesis para explicar la diversificación en la Amazonía como son: la especiación alopátrica causada por barreras fluviales (Wallace, 1852), la teoría de refugios del Pleistoceno (Haffer, 1969, 1997), la influencia de cadenas montañosas (Räsänen *et al.*, 1990), los disturbios climáticos (Bush, 1994; Colinvaux *et al.*, 1996, Colinvaux, 1998) y la especiación parapátrica causada por selección divergente a lo largo de un gradiente ecológico (Endler, 1977). Para Santos *et al.*, (2009) la diversidad de anfibios de la familia Dendrobatidae en la Amazonía es producto de dispersiones de áreas adyacentes, sobre todo desde los Andes. Hubo una rápida diversificación *in situ* de los anfibios en la Amazonía en especial desde el Mioceno-Pleistoceno por lo que la mayoría de especies se originaron en los últimos 10 millones de años. Sin embargo, esto no es válido para la familia Hylidae: la megadiversidad de las comunidades de hílidos se explica por la acumulación de especies en múltiples clados simpátricos y no por la rápida diversificación ligada a variables climáticas o a la evolución de tamaño del cuerpo (Wiens *et al.*, 2011). En este caso, el tiempo es importante para explicar los patrones de riqueza local en hílidos. Hay una alta

riqueza local en la Amazonía, donde se piensa que se originaron en el Cretácico y una baja riqueza local y regional en los Andes donde la colonización es reciente (Wiens *et al.*, 2011).

Estudios de macro-especiación como los descritos anteriormente son necesarios para entender de una mejor manera las relaciones evolutivas dentro de familias de Anuros. Sin embargo, es importante realizar estudios a nivel de género o de especies cercanamente relacionadas (Funk *et al.*, 2011; Ron *et al.*, 2006; entre otros) para entender el detalle de los procesos que generan nuevas especies.

## **3.2. OBJETO DE ESTUDIO**

### **3.2.1. HISTORIA TAXONÓMICA**

La especie estudiada fue *Hypsiboas cinerascens*, pertenece a la subfamilia Hyliinae. Inicialmente fue descrita como *Hyla cinerascen* (Spix, 1824). El género *Hypsiboas* fue resucitado por Faivovich en el 2005 y pertenece a la subfamilia Hyliinae. Contiene 80 especies (Frost, 2009). *Hypsiboas cinerascens* fue referida en la literatura como *Hyla granosa* hasta el año 2005. Actualmente, se considera que el binomial *H. cinerascens* tiene prioridad sobre *Hyla granosa* (Barrio-Amorós, 2004). La localidad tipo del sinónimo “*Hyla granosa*” es Canelos en la provincia de Pastaza (Duellman, 1978).

Hay evidencia que sugiere que *Hypsiboas cinerascens* puede contener más de una especie. Melin (1941) describe la subespecie *Hyla granosa gracilis* basándose en diferencias morfológicas. Existe evidencia morfológica de que hay diferencias a lo largo de su rango de distribución. Según Rivero (1972) desde las Guayanas hasta el Ecuador hay bastante variabilidad intrapoblacional pero no le fue posible reconocer distintas subespecies. Sin embargo, Lutz (1973) cita a la subespecie *Hyla granosa gracilis* descrita por Melin (1941). Esta especie se diferencia de la especie (*Hyla granosa*) descrita por Boulenger (1882) por tener membranas más cortas, por el color, y por la presencia y textura de la espina prepólica en machos. Melin propone al menos una subespecie para *Hyla granosa*. Más adelante, Cochran y Goin (1970) definieron por primera vez al grupo de especies *Hyla granosa* como ranas verdes con dientes vomerinos en series arqueadas y cuyos machos poseen una espina prepólica. Estos autores asignaron al grupo a *H. granosa*, *H. rubracyla* y *H. guibei*. En estudios posteriores, se relacionó a *Hyla granosa* con otras especies. Por ejemplo, Rivero (1964, 1972) la relacionó con *H. alemani* y *H. sibleszi*. Hoogmoed (1979) asoció al grupo de *H. granosa* de las Guayanas con *H. ornatissima*. Mijares-Urrutia (1992), en base a características larvarias, consideró que *H. alemani*, *H. granosa*, *H. ornatissima*, y *H. sibleszi* son miembros de un mismo grupo. Faivovich *et al.* (2005), en base a análisis moleculares, incluyen al grupo de *H. granosa* dentro del grupo de *Hypsiboas punctatus*, conformado por *Hypsiboas alemani* (Rivero, 1964), *Hypsiboas atlanticus* (Caramaschi y Velosa, 1996), *Hypsiboas granosus* (Boulenger, 1882), *Hypsiboas hobbsi* (Cochran y Goin, 1970), *Hypsiboas ornatissimus* (Noble, 1923), *Hypsiboas picturatus* (Boulenger, 1882), *Hypsiboas punctatus* (Schneider, 1799) e *Hypsiboas sibleszi* (Rivero, 1971). En la filogenia de Pyron y Wiens (2011) *H. cinerascens* tiene una ubicación inconsistente con las hipótesis de afinidad previas pues se ubica como

especie hermana de todas las demás especies de *Hypsiboas*. Sin embargo, el soporte para la ubicación de *H. cinerascens* es bajo, por lo que son necesarios estudios más exhaustivos para determinar sus afinidades evolutivas.

### **3.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

*Hypsiboas cinerascens* es una especie nocturna y arbórea que se encuentra en bosques secundarios, áreas abiertas y sobre todo pantanos. Está distribuida en las Guayanas, y en la cuenca amazónica en Brasil, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia (Azevedo-Ramos *et al.*, 2008). En Ecuador, su rango geográfico engloba las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Tungurahua, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Ron y Read, 2012). El rango altitudinal de esta especie va desde los 200 msnm hasta los 1000 msnm (Azevedo-Ramos *et al.*, 2010).

### **3.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS**

*Hypsiboas cinerascens* es una rana pequeña, en promedio, la longitud rostro-cloacal en machos es de 36.48 mm y en hembras 38.14 mm (P. Menéndez, no publicado). Al igual que otras especies de la familia Hylidae, se caracteriza por tener discos terminales en los dedos y ojos grandes. Tiene hocico redondo y un tímpano externo. La piel del dorso es finamente granular y los machos tienen espinas prepólicas en la base del pulgar. El dorso es verde pálido uniforme pero en algunas poblaciones también hay puntos amarillos o verde limón. Algunos individuos tienen manchas rojas en el dorso. La piel ventral es casi transparente pero tiene un tinte verdoso tenue (Ron y Read, 2012).

Algunos especímenes de Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, y en casi todos los de la Guayana francesa hay una línea conspicua, transversal, de color café (blanca en juveniles) entre los ojos y una franja café que se extiende hacia atrás de las narinas, sin embargo muchas veces el patrón es reducido y la barra interorbital se separa en varios puntos pequeños o desaparece completamente (Hoogmoed, 1979).

Hoogmoed (1979) describió a la especie de la siguiente manera: en el dorso tiene varias manchas grandes color café con margen blanco. Entre una y cuatro manchas muy parecidas están presentes en las patas formando una fila que puede ir desde la rodilla al talón. Las manchas también pueden estar presentes en los tarsos (de tres a cinco) extendiéndose hasta el quinto dedo. Los puntos en el dorso también se reducen en especímenes de Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, y en casi todos los de la Guayana francesa. Hay una tendencia en hembras de Surinam y Guyana de tener un patrón más extenso (Hoogmoed, 1979). Individuos presentes más al sur presentan puntos o manchas color rojo.

Lutz (1973) trata por separado a *Hyla granosa* e *Hyla cinerascens* y también incluye a la subespecie *Hyla granosa gracilis*, las diferencia sobre todo por los patrones de coloración. Se plantea que *Hyla cinerascens* tiene un color azulado-grisáceo con numerosos puntos blancos-rosados en el dorso, lo cual la diferencia de las otras especies que son más bien verdes y no todas presentan puntos (Hoogmoed, 1979). La presencia de dos tipos de patrones de coloración hizo que Lutz (1973) suponga que el material de Boulenger no era monoespecífico y que tal vez sea un complejo de dos especies, una con manchas y otra sin éstas (Hoogmoed, 1979).

Según Kok (2006) *Hypsiboas cinerascens* es claramente un complejo de por lo menos dos especies en el Parque Nacional Kaieteur en Guyanas y probablemente en las otras localidades donde se encuentra esta especie. En el Parque Nacional Kaieteur las dos especies se distinguen apenas por características morfológicas pero difieren en sus cantos de anuncio. Es por esto que se necesitan análisis moleculares para corroborar estas diferencias.

### **3.3. OBJETIVOS**

#### **3.3.1. Generales**

- Determinar si *Hypsiboas cinerascens* en la Amazonía ecuatoriana es una sola especie o forma un complejo de especies.

- Explorar los mecanismos de especiación temprana en la Amazonía usando a *H. cinerascens* como modelo.

#### **3.3.2. Específicos**

- Examinar la variación morfológica, molecular y acústica de poblaciones de *H. cinerascens*.

- Estimar los tiempos de divergencia de los potenciales grupos genéticos que forman parte de *H. cinerascens*.

- Explorar hipótesis biogeográficas para explicar patrones de diferenciación genética en *Hypsiboas*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS LINAJES DE *Hypsiboas cinerascens***

Se realizó un análisis integrativo que incluyó caracteres moleculares, morfológicos y de acústica.

### **4.2. MUESTREO POBLACIONAL**

Se realizaron salidas al campo para muestrear las poblaciones de *Hypsiboas cinerascens* en la Amazonía ecuatoriana. Se visitaron las provincias de Orellana, Tungurahua, Pastaza y Morona Santiago (Fig.1). En cada salida se grabaron cantos de anuncio. Se colectaron especímenes y se tomó muestras de tejido previo a su preservación y depósito en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ). Además, se analizaron especímenes y tejidos de otros especímenes de las colecciones QCAZ e individuos en préstamo de la División de Herpetología del Centro de Ornitología y Biodiversidad CORBIDI (Perú) (Fig.2). La lista de individuos examinados en este estudio está detallada en el Anexo 1.

### **4.3. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN**

El ADN fue extraído a partir de tejido hepático y de músculo preservados en etanol al 95% en el QCAZ. Para la extracción se siguió el protocolo de M. Fujita (no publicado) con modificaciones de María Ordóñez (Anexo 2). A partir del ADN extraído se realizó la

amplificación de los segmentos de los genes mitocondriales 12S de rRNA (12S), NADH Deshidrogenasa I (ND1) y Citocromo Oxidasa I (CO1) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el Laboratorio de Biología Molecular de la sección de Herpetología del QCAZ. Las amplificaciones se realizaron con un volumen final de 25  $\mu$ l (2.5  $\mu$ l de Buffer PCR 5X, 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5  $\mu$ l de cada primer 10 $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l de dNTPs 10mM, 0.25  $\mu$ l de Taq polimerasa, 1 unidad de ADN y 18.25  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O). Los cebadores y protocolos utilizados se describen en la Tabla 1 y el Anexo 3. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Además se eliminaron los residuos de primer y dNTPs no incorporados con el kit de purificación ExoSap-IT (GE healthcare). La secuenciación se realizó en la empresa Macrogen en Korea.

#### 4.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias obtenidas se ensamblaron en el programa Geneious Pro v. 5.4.2. (Drummond *et al.*, 2010). Se alinearon las secuencias consenso en el mismo programa con ayuda de la extensión MAFFT Multiple Alignment utilizando el algoritmo LINS-i algorithm (Kato *et al.*, 2002). Adicionalmente, se utilizó el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011) para traducir las secuencias a aminoácidos y corroborar las alineaciones de los genes codificantes. Se efectuaron análisis filogenéticos bajo los criterios de Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (MV). Los análisis se realizaron en los programas MrBayes v3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) y Garli v0.951 (Zwickl, 2006) respectivamente. Los grupos externos utilizados fueron *Hypsiboas punctatus* e *Hypsiboas pellucens* y fueron seleccionados en base a la filogenia de Wiens *et al.* (2010).

#### **4.4.1. MODELOS EVOLUTIVOS PARA LOS ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

Ya que en este análisis se incluyeron varios loci, las secuencias fueron divididas hasta en ocho particiones: (1) gen 12S, (2) primera posición para los codones de ND1, (3) segunda posición para los codones de ND1, (4) tercera posición para los codones de ND1, (5) tRNA LEU, (6) primera posición para los codones de CO1, (7) segunda posición para los codones de CO1, (8) tercera posición para los codones de CO1. El modelo de evolución para cada partición fue determinado utilizando el criterio de información Akaike con corrección para muestras pequeñas (AICc) con el programa JmodelTest 0.1.1 (Posada, 2008).

##### **4.4.1.1. ESTRATEGIAS DE PARTICIÓN**

Se probaron tres estrategias de partición de la matriz de ADN para el análisis de Inferencia Bayesiana: (EP1) una sola partición, (EP2) tres particiones (una por cada loci), y (EP3) ocho particiones (una para cada posición de los codones en loci que codifican proteínas y una para cada loci no codificante). Se escogió la mejor partición estimando el Factor Bayes usando un límite de 10 a favor de la mejor estrategia (Brandley *et al.*, 2005) en el Programa TRACER v1.5. (Rambaut y Drummond, 2007).

#### **4.4.2. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA**

En el análisis de Inferencia Bayesiana se corrieron dos búsquedas independientes con cuatro cadenas por búsqueda mediante el algoritmo de la cadena Markov de Monte

Carlo, por 40 millones de generaciones. La temperatura fue de 0.01 y el burnin de 0.1. Se descartaron las primeras generaciones porque representan muestras sucesivas no independientes que forman una cadena de Markov, en este caso las primeras cuatro millones (10%) de generaciones (burn-in) de cada análisis, luego de analizar la convergencia y valores adecuados de tamaño efectivo de la muestra (ESS) en el programa TRACER v1.5. (Rambaut y Drummond 2007).

#### **4.4.3. MÁXIMA VEROSIMILITUD**

Este análisis se llevó a cabo en el programa GARLI v.0.951 (Zwickl, 2006). Se escogió el modelo de sustitución nucleotídica estimado en JModeltest; los valores de los demás parámetros no fueron modificados. Se realizaron 10 análisis independientes para asegurar que los valores de likelihood sean consistentes. Además se empleó la técnica de bootstrap no paramétrico para evaluar el soporte de cada nodo, con 100 réplicas. El consenso de los árboles fue obtenido en Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010), utilizando la regla mayoritaria al 50%.

#### **4.5. ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA**

Para estimar el tiempo de divergencia se empleó únicamente la información del gen 12S. Se realizó este análisis en el Programa BEAST v.1.6.1 (Drummond y Rambaut, 2007). Se utilizó clados de la filogenia de la familia Hylidae de Wiens *et al.*, 2011 como puntos de calibración: Cophomantini (77.60 millones de años), Lophiohylini (69.55 millones de años), Clado *Scinax* (72.07 millones de años), Clado *Dendropsophus* (67.16

millones de años), Phyllomedusinae (71.91 millones de años). Las edades utilizadas fueron las edades de rama. Además, se incluyó al clado Pelodryadinae pero no se tomó en cuenta su edad de rama para la calibración. Se escogieron 11 individuos de *Hypsiboas cinerascens* para este análisis. Para la búsqueda se escogió el modelo log-normal no correlacionado, un tipo de “reloj molecular relajado” que asume tasas de evolución independiente en las diferentes ramas del árbol, y no una correlación a priori entre la tasa del linaje y la de su ancestro (Drummond, *et al.*, 2007). El árbol final se elaboró en TreeAnnotator con un burnin de 1000 y una probabilidad posterior de 0,05.

#### **4.6. ANÁLISIS DE BARRERAS GEOGRÁFICAS**

Para identificar la presencia de barreras geográficas al flujo de genes se utilizó el programa BARRIER v.2.2. (Manni *et al.*, 2004). Se realizó un mapa con las coordenadas de las localidades secuenciadas (Anexo 4) (se escogió un individuo por cada localidad secuenciada) siguiendo el método de Triangulación Delaunay (Anexo 5) que identifica la manera más directa de conectar (triangular) puntos adyacentes en un mapa (Manni *et al.*, 2004). Se exportó una matriz de distancias genéticas  $F_{st}$  elaborada en el Programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) para poder poner en evidencia las barreras geográficas. Para obtener la matriz se utilizó el método de distancias  $p$  no corregidas y un método de bootstrap de 500 réplicas. Se escogió el parámetro que muestra la presencia de una sola barrera en el programa BARRIER. Se siguió los métodos descritos por Manni *et al.*, (2004).

#### 4.7. CANTOS DE ANUNCIO

Se analizaron los cantos de anuncio para determinar su variación entre poblaciones. Se obtuvieron cantos de las localidades: Zanjarajuno (Provincia de Pastaza), Río Negro (Provincia de Pastaza), Parque Nacional Yasuní, vía Pompeya-Iro km 96 (Provincia de Orellana), Parque Nacional Yasuní, vía a Tivacuno (Provincia de Orellana), Santiago (Provincia de Morona Santiago) y Puerto Morona (Provincia de Morona Santiago).

Para la grabación de los cantos se utilizó una grabadora Olympus LS10 y un micrófono Sennheiser k6-ME67 unidireccional. En las grabaciones se colocó el micrófono a la mínima distancia posible del animal, de 0.5 a 1.5 m. Se tomaron datos de temperatura, fecha, hora, localidad y lugar de donde cantó el individuo. En total se obtuvieron grabaciones de 14 individuos. Los cantos están depositados en la colección de audio del QCAZ, identificados por el número QCAZ correspondiente al individuo grabado.

Los espectrogramas y oscilogramas se realizaron y editaron utilizando el programa Raven Pro, versión 1.2.1 (Bioacoustics Research Program, 2008). El espectrograma fue generado mediante una transformación Fourier directa (DFT) a partir de una muestra de 4096 puntos y una resolución de frecuencia de 10.8 Hz.

Se cuantificaron las siguientes variables: duración del llamado, notas por llamado, tiempo de subida del canto, frecuencia dominante del canto, frecuencia fundamental del canto, tiempo entre notas y tiempo entre cantos. Las variables están descritas en la Tabla 2. Se tomaron diez medidas por cada canto.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de conocer el grado de diferenciación de los cantos entre clados. Posteriormente se hizo una prueba de t pareada para analizar las variables entre clados para los componentes principales encontrados en el ACP. Los análisis se ejecutaron en el programa JMP 9 ® 9.0.1 (SAS Institute, 2010).

#### **4.8. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS**

Se cuantificó la longitud rostro-cloacal (LRC) con un calibrador digital con precisión de 0.01 mm de todos los especímenes disponibles en el QCAZ (n = 157). Para reducir el error de medición, las medidas fueron tomadas tres veces en cada espécimen. El valor utilizado en el análisis fue el promedio de los tres valores. La medida se tomó desde la punta del hocico hasta la base de la cloaca. Se realizó una Prueba de Wilcoxon para comparar las diferencias entre clados y entre sexos. También se elaboraron diagramas de caja con el fin de tener una visión general de la distribución de los datos entre sexos entre los diferentes clados. Los análisis se ejecutaron en el programa JMP 9 ® 9.0.1 (SAS Institute, 2010).

Además, se determinó la presencia o ausencia de puntos o manchas claras en el dorso y las patas tanto en fotografías como en especímenes preservados.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

Los análisis de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud muestran árboles similares. Se obtuvieron secuencias de 60 individuos para los genes mitocondriales 12S (~948 pb), CO1 (~642 pb) y ND1 (~1531 pb), incluyendo los grupos externos (Anexo 6). En la Tabla 3, se presentan los modelos evolutivos utilizados para las particiones de los análisis filogenéticos y se detallan los valores de sus diferentes parámetros.

#### **5.1.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA**

El análisis de ocho particiones, al obtener los valores más altos, demostró ser el más adecuado según el Factor Bayes (Tabla 4). Al existir topologías similares se combinaron los tres genes mitocondriales. La filogenia identificó cuatro clados con buen soporte (Fig. 3). Al primer clado (A) pertenecen las poblaciones de las provincias de Pastaza (Pomona, Zanjarajuno, El Triunfo), Tungurahua y Zamora Chinchipe, lo que representa la “alta Amazonía”, con altitudes por sobre los 800 metros. El segundo clado (B) contiene especímenes de lo que sería la “Amazonía norte”, que corresponde a tierras bajas al norte del Río Napo (Sucumbíos y el norte de Orellana) con la excepción del QCAZ 43793 que fue colectado en el banco sur del río, en la localidad de la Primavera. El clado C está conformado por poblaciones mayoritariamente de tierras bajas al sur del Río Napo, lo que sería la “Amazonía centro”, (individuos de la Provincia de Orellana). Algunos individuos de este clado pertenecen a tierras un poco más altas (de las Provincias

de Pastaza (Bobonaza), de Morona Santiago (Nuevo Israel) y un individuo de Perú (Cordillera de Kampankis)). El clado D incluye poblaciones de tierras bajas, “Amazonía sur”, al norte del Río Santiago y del Río Zamora (poblaciones de Morona Santiago y dos especímenes de Perú, Cordillera de Kampankis).

Los valores de soporte fueron mayores a 0,5 en todas las ramas. Los cladogramas C y D fueron los que presentaron los valores más altos (entre 0,77 y 1).

### **5.1.2. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD**

El análisis de Máxima Verosimilitud para cada gen mitocondrial también identifica la existencia de cuatro cladogramas. Al existir topologías similares se combinaron los tres genes mitocondriales (Fig. 4). El árbol filogenético con la mayor verosimilitud para los genes combinados señala valores de bootstrap entre 57 y 100. La filogenia es muy similar a la obtenida en el análisis de Inferencia Bayesiana, es decir, los cladogramas están conformados por las mismas poblaciones. Al igual que en los análisis de Inferencia Bayesiana, se agrupan los individuos del norte de la Amazonía (Clado A). En el segundo clado (clado B), se encuentran individuos del norte del Río Napo con la excepción de QCAZ 43793 que fue colectado en el banco sur del río, en la localidad de Primavera. En el clado C, se agrupan los individuos al sur del Río Napo y un espécimen de Kampankis, Perú. El clado D agrupa a las poblaciones al norte del Río Santiago y del Río Zamora, y los dos especímenes de Perú.

Tanto en los análisis de Inferencia Bayesiana como en los de Máxima Verosimilitud, se observan además diferencias a lo largo del rango altitudinal de esta especie. Por una parte, se encuentran poblaciones de zonas altas y que pertenecen al clado A (entre 846 msnm y 1472 msnm). Por otra parte, el resto de clados pertenecen a zonas bajas (entre 196 msnm y 332 msnm) con la excepción de los especímenes de Morona Santiago (Nuevo Israel, 1289 msnm) y Pastaza (Bobonaza, 660 msnm) que se encuentran en el clado C.

### **5.1.3. ESTIMACIONES DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA**

El árbol obtenido de este análisis (Fig. 5) señala un primer evento de divergencia, hace 15 millones de años, entre el clado D (Pankints, Puerto Morona) y los demás clados. El segundo evento (8,9 millones de años) tuvo lugar entre el clado A (Pomona, Shaime) y los clados B y C. Finalmente, entre los clados B y C la divergencia se produjo hace 5,91 millones de años. Los eventos de divergencia de las provincias de Zamora Chinchipe, Morona Santiago y sur de Pastaza fueron más antiguos que los del norte de Pastaza, Orellana y Sucumbíos.

### **5.2. ESTIMACIÓN DE BARRERAS GEOGRÁFICAS**

El análisis de barreras geográficas del programa BARRIER, dio como resultado una barrera (Fig. 6) que aísla las localidades del sur de Morona Santiago y la localidad de Shaime en Zamora Chinchipe de las del resto de la Amazonía ecuatoriana.

### 5.3. CANTOS DE ANUNCIO

La Tabla 5 resume las características de los cantos. En el análisis de componentes principales se obtuvo tres componentes con Eigenvalues  $> 1$ . Los tres componentes explican el 92,406 % de la variación total (Tabla 6). El CP1 (54,018 %) tiene cargas mayores en la frecuencia de la segunda armónica y las frecuencias fundamental y dominante. El CP2 (20,721 %) tiene cargas mayores en las mismas frecuencias pero también en el tiempo entre notas. El CP3 (17,666 %) tiene las cargas mayores en el tiempo entre cantos u el tiempo entre notas.

La proyección de los individuos sobre el CP1 y el CP2 (Fig. 7) permite separar los clados C y A del clado D (se asignó los individuos a los clados basándose en la filogenia ya que algunos están secuenciados). En el caso del CP1, el clado D tiene individuos con valores altos. En el caso del CP2, el clado A presenta una separación en función del clado C, sin embargo, el clado D no muestra ninguna agrupación con el resto de clados. Los individuos no secuenciados se agrupan con los del clado A.

Existen diferencias significativas en los valores de CP entre todos los clados con excepción del clado A y los individuos no secuenciados en el CP I ( $t = 2,17881$ ,  $GL=15$ ,  $p = 0,0515$ ). En el CP II no hay diferencias significativas entre ninguno de los clados (Tabla 7). Finalmente en el CP III, existen diferencias significativas entre el clado A y los individuos no secuenciados y entre el clado C y los individuos no secuenciados ( $t = 2,17881$ ,  $GL = 15$ ,  $p = 0,0073$  y  $p = 0,0409$ , respectivamente) (Tabla 6).

Los estadísticos descriptivos (Tabla 5) muestran variación entre clados sobre todo en las frecuencias fundamental y de la segunda armónica. El clado C presenta valores más altos para las frecuencias fundamental y dominante (1743,84–1839,50 Hz) en comparación con el clado A (1648,57–1723,73 Hz) y D (1560,41–1962,02 Hz). Al no existir cantos de individuos pertenecientes al clado B, no se incluyó a este clado en el análisis.

## **5.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS**

### **5.4.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS**

Los resultados obtenidos para las medidas LRC muestran diferencias significativas entre clados, entre machos y entre hembras (Tabla 8; Figs. 8 y 9). En el caso de los machos, existen diferencias entre todos los pares de clados a excepción de D–B y C–A en base a la prueba de Wilcoxon. En machos, la LRC promedio varía desde 32,74 cm hasta 37,69 cm. Las mayores LRC promedio las presentan los clados A (rango 34,99–37,77 cm) y C (rango 33,71–38,11 cm). Las hembras muestran diferencias entre todos los clados. El rango de tamaños en hembras es mucho mayor que en machos (31,9271–40,4125 cm en promedio). Los estadísticos descriptivos y los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 8 y 9.

### **5.4.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS**

Se encontraron variables cualitativas que fueron diferentes entre los clados resultantes de los análisis filogenéticos. Principalmente, se analizó la presencia o ausencia

de manchas en el dorso. Los diferentes patrones de coloración se detallan en la Tabla 10. Existen diferencias sobre todo en la presencia o ausencia de puntos de color rojo, amarillos o negros. Se pudo observar que hay variación entre clados, y dentro de un mismo clado (Fig. 10–13). Los individuos del clado A se caracterizan por la presencia de pequeños puntos rojos en el dorso y en las patas y por ser de color verde claro o verde amarillento. Sin embargo, algunos individuos no presentaron ningún tipo de puntos en el dorso ni en las patas. En el caso del clado B, los individuos presentaron una cierta coloración rojiza en el dorso y, adicionalmente, la presencia de puntos amarillos en dorso y patas. En este clado, todos los individuos tenían la presencia de puntos. El clado C presenta individuos color verde claro con puntos amarillos, existen además individuos con coloración rojiza en el dorso e individuos sin puntos. Finalmente en el clado D, hay individuos con puntos amarillos que al mismo tiempo presentan abundantes puntos rojos en el dorso y patas. Hay individuos que solo presentan puntos rojos (Fig. 10–13). Al no poder observar claramente la coloración de las manchas en los individuos preservados, se divide a los especímenes de manera general en dos grupos: manchados y no manchados.

## 6. DISCUSIÓN

El análisis integrado realizado en este estudio, permitió entender de mejor manera como está compuesto el complejo de especies de *Hypsiboas cinerascens* en la Amazonía ecuatoriana y peruana. El estudio sugiere la existencia de dos especies y alta diferenciación genética inter a intraespecífica.

### 6.1. ANÁLISIS INTEGRATIVO

Los análisis filogenéticos sugieren que *Hypsiboas cinerascens* es un complejo de especies formado por cuatro clados con alto soporte. Las filogenias separan especímenes pertenecientes a zonas altas (desde 846 msnm hasta 1472 msnm) (clado A y especímenes de Nuevo Israel y Bobonaza del clado C), y aquellos de zonas bajas (de 187 msnm hasta 400 msnm) (clado B, gran parte del clado C y clado D). Ya que la mayoría de especímenes están restringidos a elevaciones menores a los 400 m, la distribución del clado A probablemente sea producto de un evento de colonización desde zonas bajas. Esta forma de colonización también se reporta en estudios de Hylidae amazónicos como los de Ron *et al.*, (2012) con el complejo de especies *Osteocephalus buckleyi*, Salerno *et al.*, (2012) con *Tepuihyla* y su especie hermana *Osteocephalus exophthalmus* y Graham *et al.*, (2004) con dendrobátidos.

De igual forma, hay una separación entre las muestras del norte y del sur del Río Napo (clado B al norte y C al sur). En efecto se ha sugerido que los ríos han jugado un papel importante en dar forma a los patrones actuales de variación genética y ecológica

dentro de especies y comunidades en la Amazonía (Gascon *et al.*, 2000). Se debe comprobar si el Río Napo actuó o no como una barrera fluvial para esta especie.

Estudios recientes han demostrado que existe un alto nivel de diversidad críptica en la Amazonía. Funk *et al.*, 2011 hacen un análisis integrativo que muestra una alta proporción de especies crípticas en clados de *Engystomops* y de *Hypsiboas*. Asimismo, Fouquet *et al.*, 2007 revelan la diversidad críptica de *Scinax ruber* y *Rhinella margaritifera*. Estudios a nivel de micro-especiación como estos y el presente estudio son importantes para entender las relaciones genéticas dentro de una misma especie y entre especies cercanamente relacionadas. Este trabajo corrobora la presencia de una alta proporción de especies crípticas en anfibios amazónicos. Sin embargo, la evidencia puramente genética es una herramienta taxonómica importante pero, en muchos casos, insuficiente para definir límites de especies sin hacer referencia a otras características como morfología externa y cantos de anuncio (Ron *et al.*, 2012).

Morfológicamente se encontraron también diferencias entre clados, sin embargo estos caracteres no fueron concluyentes. Se observaron diferencias morfológicas parciales entre clados puesto que en algunos individuos se observaron características intermedias o correspondientes a otros clados. A pesar de que no se realizó ningún tipo de análisis estadístico con la presencia o ausencia de tipos de coloración o manchas en el dorso y patas, es evidente que esta es una característica variable en este complejo de especies. Por una parte, existen clados con algún tipo de mancha, o puntos en el dorso y patas y, por otra parte, clados que carecen de éstos. Esto concuerda con la descripción realizada por Hoogmoed (1979) que discutió en base a patrones de coloración la posibilidad de que

*Hypsiboas cinerascens* sea un complejo de especies. Existen individuos ya sea con manchas rojas (clados A, B y D) o puntos amarillos (B, C y D) en todos los clados, pero dentro de los clados A y C también existen individuos que no poseen manchas y tienen piel granular en el dorso y patas. Al no tener información de la coloración de las manchas en vida, se dividió a los especímenes en manchados y no manchados. En los clados A y C, se pudo constatar que dentro de una misma localidad (Río Negro, Yasuní) coexisten estos dos tipos de coloración en el dorso en individuos. Por lo tanto, se debería demostrar que el polimorfismo de color también es genético y así, que los clados representan especies diferentes.

Como se mencionó anteriormente, Lutz (1973) separó morfológicamente a *Hyla cinerascens* y a *Hyla granosa*. En su estudio de las especies brasileras de *Hyla* diferencia a estas dos especies por la coloración del dorso, presencia de puntos cafés o rojizos en el dorso, tímpano (distintivo o no), y por el color del iris. Además, Lutz supuso que el material de Boulenger no era monoespecífico y que contenía dos especies: una con el dorso sencillo y otra ornamentada la cual podía estar relacionadas con *Hyla ornatissima*. Sugirió el nombre de *Hyla granosa* para la especie ornamentada y para la otra, *Hyla inornata*, pero este nombre nunca se validó. Además, Lutz nombra en su trabajo a la subespecie *Hyla granosa gracilis*. Hoogmoed (1979) describe una coloración similar. En especímenes vivos, el dorso es verde con patas y dedos amarillos-verdosos. En el dorso hay la presencia de puntos rojos y una serie transversal de puntos rojos entre los ojos. Este patrón de coloración sería muy similar al observado en los especímenes del clado D, por ejemplo. Sin embargo, basándose en material antiguo, Hoogmoed pensó que el patrón ornamentado estaba presente solamente en hembras; idea que refutó con el nuevo material,

con lo que comprobó que el dimorfismo en la coloración no existía para esta especie. Lo expuesto también se comprueba en este estudio puesto que no hay dimorfismo entre las especies estudiadas. Esto también podría explicarse por qué muchos grupos de anfibios tienen su morfología conservada y carecen de caracteres externos obvios (Fouquet *et al.*, 2007). En el caso de *Hypsiboas cinerascens*, no se encontró un carácter externo evidente (además de las manchas o puntos) que pueda diferenciar los clados entre sí.

Finalmente, las vocalizaciones en anuros juegan un rol importante para el reconocimiento de especies. Las relaciones entre especies de los trópicos son particularmente complejas y el comparar los cantos de anuncio representa una alternativa para definir diferencias y afinidades con la ayuda de un parámetro cuantificable (De la Riva *et al.*, 1997). El análisis de cantos de anuncio muestra que existen diferencias sobre todo en las frecuencias de la primera y segunda armónica entre los diferentes clados. También en lo que respecta el tiempo de subida y la duración del canto. Existen diferencias sobre todo cuando se compara el clado D con el resto de clados.

Inicialmente, el canto de *Hypsiboas cinerascens* fue descrito por Duellman (1978) como un canto de dos a cuatro notas, por lo general: “boop–boop–boop”. La duración de las notas en los cantos analizados en esa publicación fue de 0,078 segundos y la frecuencia dominante promedio de 1390 Hz. Posteriormente, De la Riva *et al.* (1997) describió al canto como una serie de dos a siete notas cortas que decrecen en intensidad, con una frecuencia dominante promedio de 1327 Hz y una segunda armónica de 2650 Hz. Los cantos analizados en este estudio muestran valores cercanos a los encontrados por Duellman y De la Riva *et al.* Las frecuencias fundamental y dominante varían entre

1560,41 Hz en el clado D hasta 1839,50 Hz en el clado B. El tiempo entre notas por otra parte fue en promedio de 0,08 en el clado C; 0,11 en el clado A y 0,12 en el clado D. Además el número de notas en los clados varía entre dos y cuatro notas por llamado y es similar al “boop-boop-boop” de Duellman.

Se pudo observar que existe mayor diferenciación molecular que morfológica o acústica. Al mismo tiempo, hay más diferencias bioacústicas que morfológicas. Actualmente, los cantos en anuros están considerados como caracteres importantes para la identificación de especies, incluso hasta más distintivos que los caracteres morfológicos (Roy y Elepfandt, 1993). Por un lado, no existen diferencias muy marcadas en lo que respecta a las LRC y esto es consistente con estudios recientes ya que se sabe que los cantos evolucionan más rápido que la morfología y que esto puede deberse a la selección sexual, entre otras causas (Funk *et al.*, 2011). En algunos anfibios las diferencias morfológicas no representan un buen indicador de aislamiento reproductivo. Es por esta razón que es probable que una gran proporción de la diversidad de anfibios siga sin descubrirse, no solamente a nivel de especie sino en linajes más antiguos (Pfenninger y Schwenk, 2007).

Al considerar en conjunto los análisis filogenéticos, morfológicos y de acústica, se puede inferir parcialmente que *Hypsiboas cinerascens* es un complejo de por lo menos dos especies. Al existir diferencias marcadas entre el clado D y el resto de clados, se podría considerar que este clado representa una especie y los clados A, B y C otra. El clado D demuestra mayores diferencias genéticas y por lo tanto puede tratarse de una especie candidata confirmada.

## 6.2. BARRERAS GEOGRÁFICAS Y TIEMPO DE DIVERGENCIA

El análisis de barreras geográficas dio como resultado la presencia de una barrera en la provincia de Morona Santiago que separa a esta provincia del resto de la Amazonía ecuatoriana. La barrera podría representar la Cordillera de Cutucú. Cutucú cruza la provincia de Morona Santiago de norte a sur, está separada de la cordillera Real de los Andes y es parte de la Zona Sub-Andina (Hungerbühler *et al.*, 2002). Esto también significaría que está separando zonas bajas de zonas altas.

La diferenciación genética entre las poblaciones a ambos lados del Río Napo sugiere que el río es una barrera al flujo génico. Gehring *et al.*, 2012, sugieren que los grandes cuerpos de agua representan las barreras más obvias para la dispersión y, por lo tanto, para el flujo génico en organismos terrestres. Además, debido a su extensión, los grandes ríos juegan un rol importante en la delimitación geográfica de la distribución de especies. A pesar de que varios estudios (Aleixo, 2004; Cheviron *et al.*, 2005; Hall y Harvey, 2002; Hayes y Sewlal, 2004; Höglund y Shorey, 2004) muestran ningún o poco soporte para considerar a ríos como barreras para anfibios, aves o mamíferos, la evidencia de dos clados en ambos bancos del Río Napo, puede sugerir que este río actuó como barrera. En el trabajo de Funk *et al.*, 2007, se comprueba la hipótesis de barreras fluviales (en ese caso Río Madre de Dios) para *Engystomops petersi* (*Physalaemus petersi*), sin embargo, no sucedió lo mismo con el Río Napo. Estudios de *E. petersi* y de otros taxa anteriores a este apoyan la idea de que el efecto de barrera de ríos amazónicos varía dependiendo de la especie. Gascon *et al.*, (1998) encontró que el Río Juruá no es una barrera importante para *E. petersi*. Varios otros estudios muestran poco apoyo para la

hipótesis de las barreras riverinas en anfibios, aves y mamíferos (Aleixo, 2004; da Silva y Patton, 1993; Gascon, 1996; Gascon *et al.*, 1996, 1998, 2000; Loughheed *et al.*, 1999; Symula *et al.*, 2003). En contraste con estudios en mariposas y aves amazónicas (Aleixo, 2004; Cheviron *et al.*, 2005; Hall y Harvey, 2002; Hayes y Sewlal, 2004; Höglund y Shorey, 2004) que si lo hacen. El Río Chagres en Panamá también actúa como barrera al flujo génico en *P. pustulosus* (Lampert *et al.*, 2003) y su especie hermana *P. petersi* (Ron *et al.*, 2006).

Según las estimaciones del tiempo de divergencia, el primer evento de separación tuvo lugar entre el clado D (Morona Santiago) y el ancestro común de los clados A, B y C hace aproximadamente 15 millones de años lo que correspondería con el Mioceno y, por lo tanto, con la época en donde ocurrió la mayor orogénesis en la Amazonía (Koscinski *et al.*, 2008). Así mismo, en este período se registra el levantamiento de roca de las fallas de bloques del Napo y de Cutucú, y el transporte de sedimentos hasta la Depresión del Pastaza (Martín-Gombojav y Winkler, 2007). Al coincidir el tiempo de la primera radiación con este el levantamiento de la Cordillera de Cutucú, podemos afirmar que efectivamente se trata de esta barrera la que pudo ser responsable de este evento. El segundo evento de divergencia se da entre individuos de Zamora Chinchipe y Pastaza (Pomona) y el resto de poblaciones, y se da aproximadamente hace 3 millones de años, tiempo que abarca el levantamiento más importante de los Andes y la formación de hábitats de grandes altitudes (Gregory-Wodzicki, 2000) que fueron barreras significativas para el desplazamiento. Por lo tanto, hubo aislamiento de poblaciones durante el levantamiento de los Andes. La diversificación de varios taxa en América del Sur ha sido influenciada por el levantamiento de los Andes que comenzó en el Cretácico tardío

aproximadamente hace más de 60 millones de años. Aunque no fue hasta el Mioceno medio (11-14 millones de años) que las regiones centrales excedieron los 1000 msnm (Potts y Behrensmeyer, 1992; Gregory-Wodzicki, 2000). Además, estimados de tiempo de divergencia han revelado que muchos linajes de anfibios en América del Sur tienen millones de años, incluso entre especies cercanamente relacionadas (Grant *et al.*, 2006; Heinicke *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2012, Santos *et al.*, 2009) o dentro de una misma especie (Fouquet *et al.*, 2007, 2012; Funk *et al.*, 2012).

### **6.3. HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS PARA EXPLICAR PATRONES DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA**

El trabajo de Santos *et al.*, 2009 propone tres patrones de riqueza de especies, los cuales son potenciales explicaciones para las diferencias que existen actualmente en la diversidad existente en los Neotrópicos: (1) alta migración a una región después de que las condiciones geoclimáticas han sido re-establecidas; (2) diversificación gradual *in situ* de clados endémicos antiguos, promoviendo la acumulación de especies; (3) rápida diversificación *in situ* de clados endémicos después de que las condiciones climáticas han sido establecidas. Estos patrones se aplican a diferentes áreas dependiendo del contexto histórico. El levantamiento de los Andes en el límite Mioceno-Pleistoceno causó cambios significativos en la tasa de diversificación en la zona de transición de tierra bajas. Este es el caso de algunos dendrobátidos que se encuentran a ambos lados de los Andes. Los resultados tanto de barreras geográficas con la presencia de la Cordillera de Cutucú como los del tiempo de divergencia que coinciden con el tiempo de levantamiento de esta cordillera y con el levantamiento de elevaciones más altas pueden sugerir algo similar para *Hypsiboas*. *H. cinerascens* pudo haber entonces sido una especie de zonas bajas que migró

más tarde a zonas más altas.

Por otro lado, las diferencias a ambos bancos del Río Napo muestran que este Río podría ser una barrera entre los clados B y C. El trabajo de Funk *et al.*, (2007) no tuvo buen apoyo en el caso del Río Napo para tres predicciones de la hipótesis de las barreras riverinas: (1) poblaciones monofiléticas existen a ambos lados del río; (2) la divergencia genética entre poblaciones está correlacionada con la presencia de ríos, sin tomar en cuenta los efectos de las distancias geográficas; (3) la divergencia genética entre poblaciones trans-riverinas serán mayores en la parte baja del río que en los cabezales. Sin embargo, el estudio de Funk *et al.*, (2007) si tuvo buen apoyo para el Río Madre de Dios. Se debe por lo tanto comprobar en posteriores estudios si en efecto el Río Napo actúa como barrera geográfica para este complejo de especies.

Por todo lo mencionado anteriormente, se concluye que *Hypsiboas cinerascens* es probablemente un complejo de dos especies aquí en Ecuador. Se puede suponer que se trató de una colonización de zonas bajas hacia zonas altas. El clado D representaría una especie candidata confirmada y los clados A, B y C representarían especies candidatas no confirmadas.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base al análisis integrativo realizado en este estudio, se reconocen cuatro clados para el complejo de especies de *Hypsiboas cinerascens*. Se puede inferir parcialmente que se trata de dos especies.

Los caracteres genéticos son los que representaron una mayor variación y definen cuatro clados: alta Amazonía (clado A), Amazonía norte (clado B), Amazonía centro (clado C) y Amazonía sur (clado D). Uno de los clados (clado A) es exclusivo de zonas altas y el resto de zonas bajas con la excepción de los individuos del clado C pertenecientes a Pastaza y a Morona Santiago. Existe además dos clados a ambos bancos del Río Napo.

Los análisis de acústica y morfológicos son equívocos para diferenciar los clados entre sí. En el caso de la morfología existen diferencias entre las LRC en hembras entre clados. Por otra parte los caracteres morfológicos cualitativos separaron a individuos manchados e individuos no manchados. Se pudo observar por lo tanto que existe mayor diferenciación molecular que morfológica o de acústica.

Se detectó una barrera geográfica en la Provincia de Morona Santiago. Los tiempos de divergencia corresponden con el levantamiento de la cordillera del Cutucú.

Para estudios posteriores, es importante incluir más localidades de los otros países en donde está presente esta especie como son: Guayanas, Brasil, Venezuela y Bolivia.

Además, sería importante añadir cantos pertenecientes al clado B, ya que no se incluyeron en este estudio y, por lo tanto, no se puede saber si es que existen diferencias con respecto a los otros clados.

## 8. LITERATURA CITADA

- Aleixo, A., 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58: 1303–1317.
- Azevedo–Ramos, C., La Marca, E., Coloma, L.A. y Ron, S. 2008. *Hypsiboas cinerascens*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Barrio–Amorós, C.L. 2004. Amphibians of Venezuela. Systematic list, distribution and references. *Revista de Ecología Latino–Americana*. Mérida 9: 1–48.
- Bioacoustics Research Program. 2008. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.3) [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Disponible en: <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- Brandley, M.C., Schmitz, A., Reeder, T.W., 2005. Partitioned Bayesian analyses, Partition choice, and the phylogenetic relationships of scincid lizards. *Systematic Biology* 54: 373–390.
- Boulenger, G.A. 1882. Catalogue of the Batrachia Salientias. Ecaudata in the collection of the British Museum, 2nd ed. London: Taylor and Francis.
- Bush, M.B., 1994. Amazonian speciation: a necessarily complex model. *Journal of Biogeography* 21: 5–17.
- Caminer, M. A. 2010. Sistemática del complejo de especies *Hypsiboas fasciatus* (Günther, 1858) e *Hypsiboas calcaratus* (Troschel, 1848) (Anura: Hylidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. PUCE. Quito.

- Caramaschi, U., y Velosa, A. 1996. Nova especie de *Hyla* Laurenti, 1768 do leste brasileiro (Amphibia, Anura, Hylidae). Boletim do Museu Nacional, Nova Serie, Zoologia 365: 1–7.
- Cavender–Bares, J., Kozak, K.H., Fine, P.V.A. y Kembel, S.W. 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. Ecology Letters 12: 693–715.
- Cheviron, Z.A., Hackett, S.J. y Capparella, A.P., 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. Molecular Phylogenetics and Evolution 36: 338–357.
- Cisneros-Heredia, D. y McDiarmid, R.W. 2006. A new species of the genus *Centrolene* (Amphibia: Anura: Centrolenidae) from Ecuador with comments on the taxonomy and biogeography of Glassfrogs. Zootaxa 1244: 1–32
- Cochran, D.M., y Goin, C.J. 1970. Frogs of Colombia. Bulletin of the United States National Museum 288: 1–655.
- Colinvaux, P.E., De Oliveira, P., Moreno, J.E., Miller, M.C., y Bush, M.B., 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. Science 274: 85–88
- Colinvaux, P.E., 1998. A new vicariance model for Amazonian endemics. Global Ecology Biogeography Letters 7: 95–96
- Da Silva, M.N.F. y Patton, J.L., 1993. Amazonian phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal echimyid rodents (Caviomorpha). Molecular Phylogenetics and Evolution 2: 243–255.
- De la Riva, I., Márquez, R. y Bosch, J. 1997. Description of the advertisement calls of some South American Hylidae (Amphibia, Anura): Taxonomic and methodological

- consequences. *Bonner Zoologische Beiträge* 47: 175–185.
- Drummond, A.J. y Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214
- Drummond, A., Ho, S., Rawlence, N. y Rambaut, A. 2007. A rough guide to BEAST 1.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T. y Wilson A. 2010. Geneious v5.3.4, Disponible en: <http://www.geneious.com>
- Duellman, W.E. 1978. The biology of an Equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous Publications of the University of Kansas Museum of Natural History* 65: 1–352.
- Endler, J.A., 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. y Wheeler, W.C., 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 294: 1–240.
- Fouquet, A., Vences, M. Salducci, M., Meyer, A. Marty, C., Blanc, M. y Gilles, A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 567–582.
- Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., Orrico, V., Lyra, M., Joventino Roberto, I., Kok, P., Haddad, C. y Rodrigues, M. 2012. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of Physelaphryninae frogs reveals

- unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 547–561.
- Frost, D.R., 2009. Amphibian species of the World: an online reference [web application]. American Museum of Natural History, New York.  
<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>
- Funk, W.C., Caldwell, J.P., Peden, C.E., Padial, J.M., De la Riva, I. y Cannatella, D.C. 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 825–837.
- Funk, W.C., Caminer, M. y Ron, S.R. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society*. 279: 1806–1814
- Gascon, C., Loughheed, S.C. y Bogart, J.P., 1996. Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica* 28: 376–387.
- Gascon, C., Loughheed, S.C. y Bogart, J.P., 1998. Patterns of genetic differentiation in four species of Amazonian frogs: a test of the riverine barrier hypothesis. *Biotropica* 30: 104–119.
- Gascon, C., Malcolm, J.R., Patton, J.L., da Silva, M.N.F., Bogart, J.P., Loughheed, S.C., Peres, C.A., Neckel, S. y Boag, P.T., 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 97: 13672–13677.
- Gehring, P.S., Pabijan, M., Randrianirina, J.E., Glaw, F., y Vences, M. 2012. The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs

- (Heterixalus). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64: 618–632.
- Graham, C.H., Ron, S.R., Santos, J.C., Schneider, C.J. y Moritz, C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution* 58: 1781–1793.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., Gagliardo, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, D.B., Noonan, B.P., Schargel, W.E. y Wheeler, W.C., 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 299: 1–262.
- Gregory-Wodzicki, K. M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin*. 112: 1091–1105.
- Haffer, J. 1969. Speciation in amazonian forest birds. *Science* 165: 131–137.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: An overview. *Biodiversity and Conservation* 6: 451–476.
- Hall, J.P.W., y Harvey, D.J., 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riordinid butterflies. *Evolution* 56: 1489–1497.
- Hayes, F.E., y Sewlal, J.A.N., 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31: 1809–1818.
- Heinicke, M.P., Duellman, W.E. y Hedges, S.B., 2007. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104: 10092–10097.
- Höglund, J., Shorey, L., 2004. Genetic divergence in the superspecies *Manacus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 439–447.

- Hoogmoed, M. S. 1979. Resurrection of *Hyla ornatissima* Noble (Amphibia: Hylidae) and remarks on related species of green tree frogs from the Guiana area. Notes on the Herpetofauna of Surinam VI. Zoologische Verhandlinger.
- Hungerbühler, D., Steinmann, M., Winkler, M., Seward, D., Egüez, A., Peterson, D.E., Helg, U., y Hammer, C. 2002. Neogene stratigraphy and Andean geodynamics of southern Ecuador. *Earth-Science Reviews* 57: 75–124
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., y Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research* 30: 3059–3066.
- Kok, P. 2006. A new species of *Hypsiboas* (Amphibia: Anura: Hylidae) from Kaieteur National Park, eastern edge of the Pakaraima Mountains, Guyana. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* 76: 191–200.
- Koscinski, D., Handford, P., Turbaro, P., Sharp, S. y Loughheed, S. 2008. Pleistocene climate cycling and diversification of the Andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. *Molecular Ecology* 17 (8): 2012–2025.
- Lampert, K.P., Rand, A.S., Mueller, U.G. y Ryan, M.J., 2003. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Ecology* 12:3325–3334.
- Loughheed, S.C., Gascon, C., Jones, D.A., Bogart, J.P. y Boag, P.T., 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings Royal Society London Biological Sciences* 266: 1829–1835.
- Lutz, B. 1973. Brazilian Species of *Hyla*. Austin: University of Texas Press.
- McGarigal, K. Cushman, S. y Stafford, S. 2000. Multivariate statistics for wildlife and

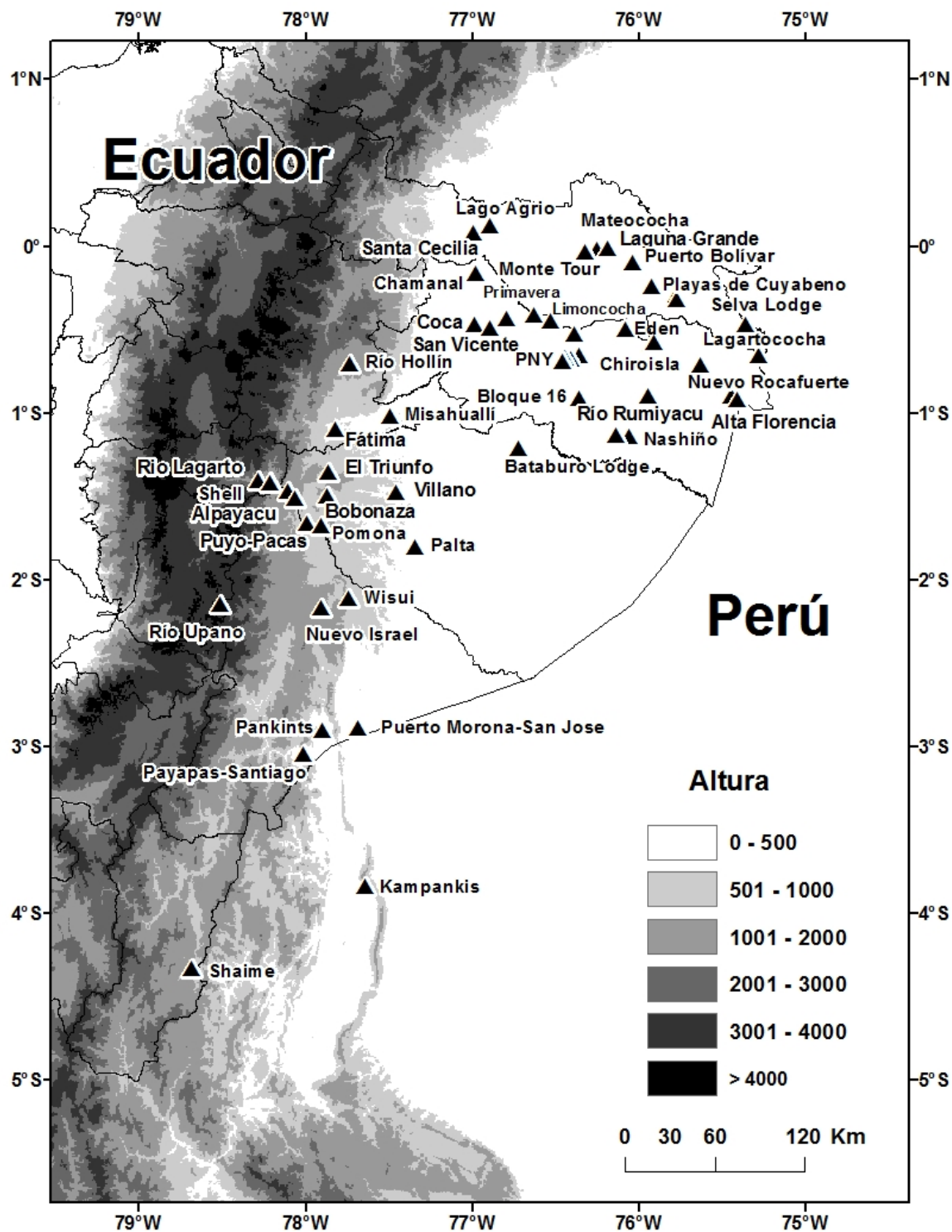
- ecology research. Springer, New York.
- Maddison, W.P. y Maddison, D.R. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.74. <http://mesquiteproject.org>
- Manni F., Guérard, E. y Heyer, E., 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology* 76: 173–190.
- Martin-Gombojav, N., y Winkler, W. 2007. Recycling of Proterozoic crust in the Andean Amazon foreland of Ecuador: implications for orogenic development of the Northern Andes. *Terra Nova* 20 (1): 22–31.
- Melin, D.E. 1941. Contribution to the knowledge of the Amphibia of South America. Göteborgs Kungl Vetenskaps-och Vitterhets-samhälles Handlingar Serien B, Matematiska och Naturvetenskapliga Skrifter 1.
- Menéndez, P. (no publicado) en Ron, S. R. y Read, M. 2012. *Hypsiboas cinerascens*. En: Ron, S. R., Coloma, L.A., Guayasamin, J.M. y Yanez-Muñoz, M. AmphibiaWebEcuador. Version 2012.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1319>>, acceso diciembre 09, 2012.
- Mijares-Urrutia, A. 1993. The tadpole of *Hyla granosa* (Anura, Hylidae) from southeastern Venezuela. *Revista Chilena de Historia Natural* 66:143–147.
- Noble, 1923. Holotype: AMNH 13491, by original designation. Type locality: "Meamu, Mazaruni R., British Guiana". *Zoologica*, New York, 3: 291.
- Pfenninger, M. y Schwenk, K., 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7.

- Potts, R. y Behrensmeyer, A.K. 1992. Late Cenozoic terrestrial ecosystems. En: *Terrestrial Ecosystems Through Time Evolutionary Paleocology of Terrestrial Plants and Animals* (eds Behrensmeyer AK, Damuth JD, DiMichele WA *et al.*), 419–541. Chicago University Press, Chicago.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* Vol 25: 1253–1256.
- Pyron, R.A. y Wiens, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 543–583.
- Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer v 1.4. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Räsänen, M.E., Salo, J.S., Jungner, H., Romero Pittman, L., 1990. Evolution of the western Amazon lowland relief: impact of Andean foreland dynamics. *Terra Nova* 2, 320–332.
- Rivero J.A. 1964. Salientios (Amphibia) en la colección de la Sociedad de Ciencias Naturales la Salle de Venezuela. *Caribbean Journal of Science* 4: 297–305.
- Rivero, J.A. “1971” [1972]. Notas sobre los anfibios de Venezuela. I. Sobre los hilidos de la Guayana venezolana. *Caribbean Journal of Sciences* 11: 181–188.
- 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.
- Ron, S. R. y Read, M. 2012. *Hypsiboas cinerascens*. En: Ron, S. R., Coloma, L. A., Guayasamin, J. M. y Yanez-Muñoz, M. *AmphibiaWebEcuador*. Version 2012.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del

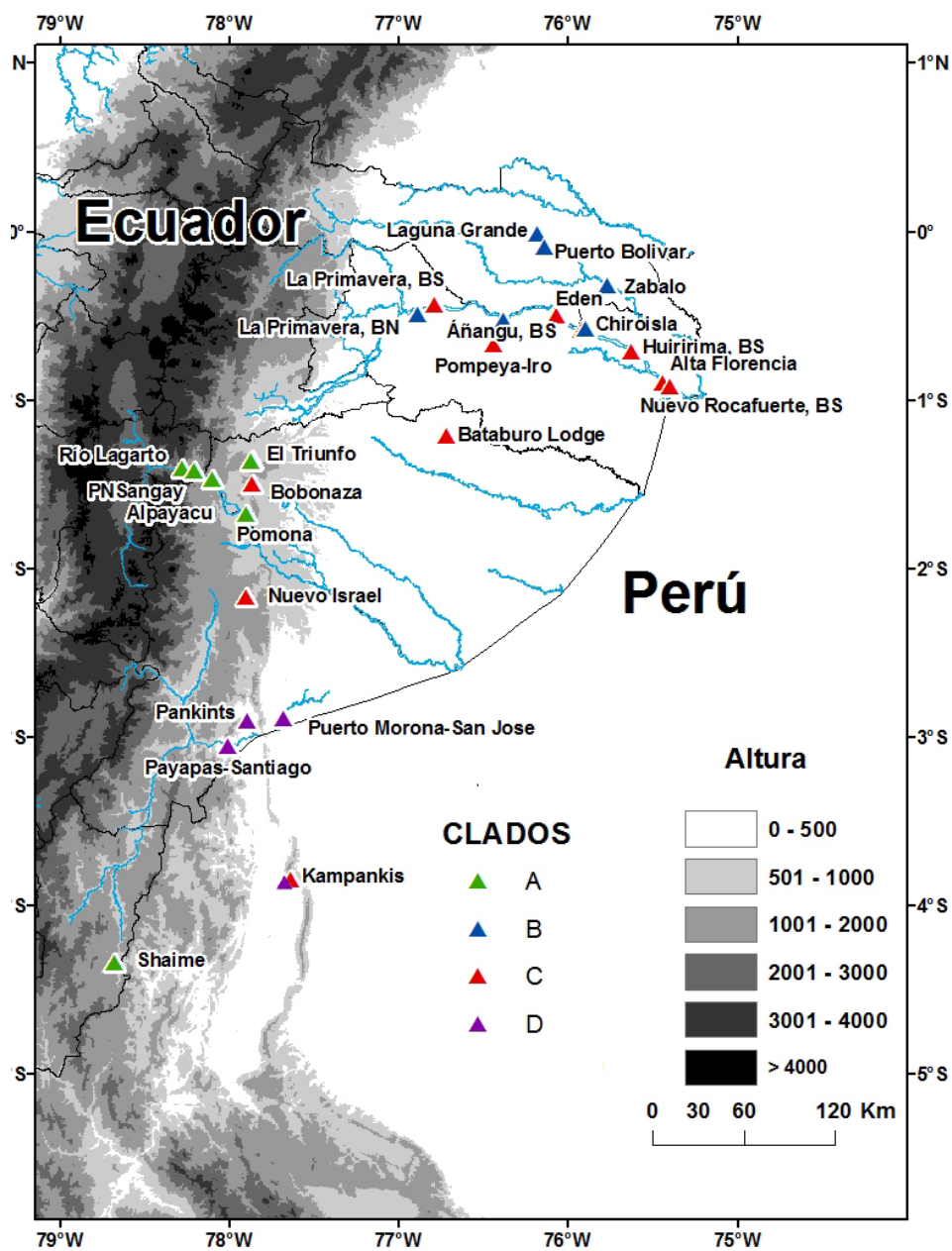
- Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1319>>, acceso diciembre 09, 2012.
- Ron, S. R., Venegas, P. J., Toral, E., Read, M., Ortiz, D. y Manzano, A. L. 2012. Systematics of the *Osteocephalus buckleyi* species complex (Anura, Hylidae) from Ecuador and Peru. *Zookeys* 229:1–52.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Roy, D. y Elepfandt, A. 1993. Bioacoustic analysis of frog calls from northeast India. *Journal of Biosciences* 18:381–393.
- Salerno, P.E., Ron, S.R., Senaris, J.C., Rojas-Runjaic, F.J.M., Noonan, B.P., Cannatella, D.C. 2012. Ancient Tepui summits harbor young rather than old lineages of endemic frogs. *Evolution* 66: 3000–3013.
- Santos, J.C., Coloma, L.A., Summers, K., Caldwell, J.P., Ree, R.H. y Cannatella, D.C. 2009. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from Late Miocene Andean lineages. *PLoS Biology* 7: 1–14.
- SAS Institute. 2010. JMP 9 ® 9.0.1 Software. <http://www.jmp.com/software/>
- Schneider, J. G. 1799. *Historia Amphibiorum Naturalis et Literariae. Fasciculus Primus. Continens Ranas, Calamitas, Bufones, Salamandras et Hydros in Genera et Species Descriptos Notisque suis Distinctos* [Jena]: Friederici Frommanni.
- Symula, R., Schulte, R. y Summers, K., 2003. Molecular systematics and phylogeography of Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 452–475.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Wallace, A.R., 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London* 20: 107–110.
- Webb, C.O., Ackerly, D.D., McPeck, M.A. y Donoghue, M.J. 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 33: 475–505.
- Wiens, J.J., Fetzner, J.W., Parkinson, C.L. y Reeder, T.W., 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology* 54:719–748.
- Wiens, J.J., Graham, C.H., Moen, D., Smith, S. y Reeder, T.W. 2006. Evolutionary and Ecological Causes of the Latitudinal Diversity Gradient in Hylid Frogs: Treefrog Trees Unearth the Roots of High Tropical Diversity. *The American Naturalist* 168:5.
- Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Hua, X. y Moen, D.S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 871–882.
- Wiens, J.J., Pyron, R.A. y Moen, D.S. 2011. Phylogenetic origins of local–scale diversity patterns and the causes of Amazonian megadiversity. *Ecology Letters* 14: 643–652
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

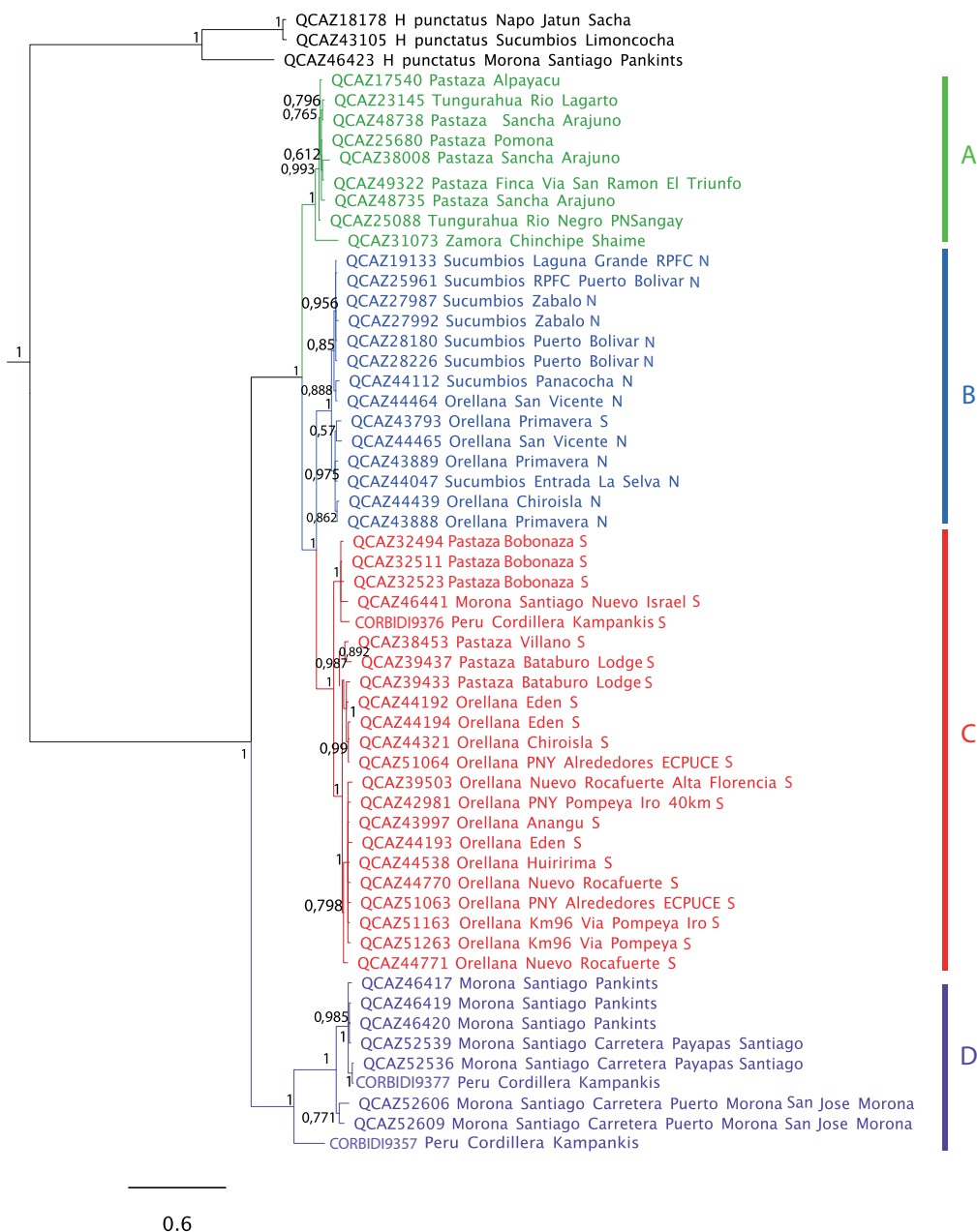
## 9. FIGURAS



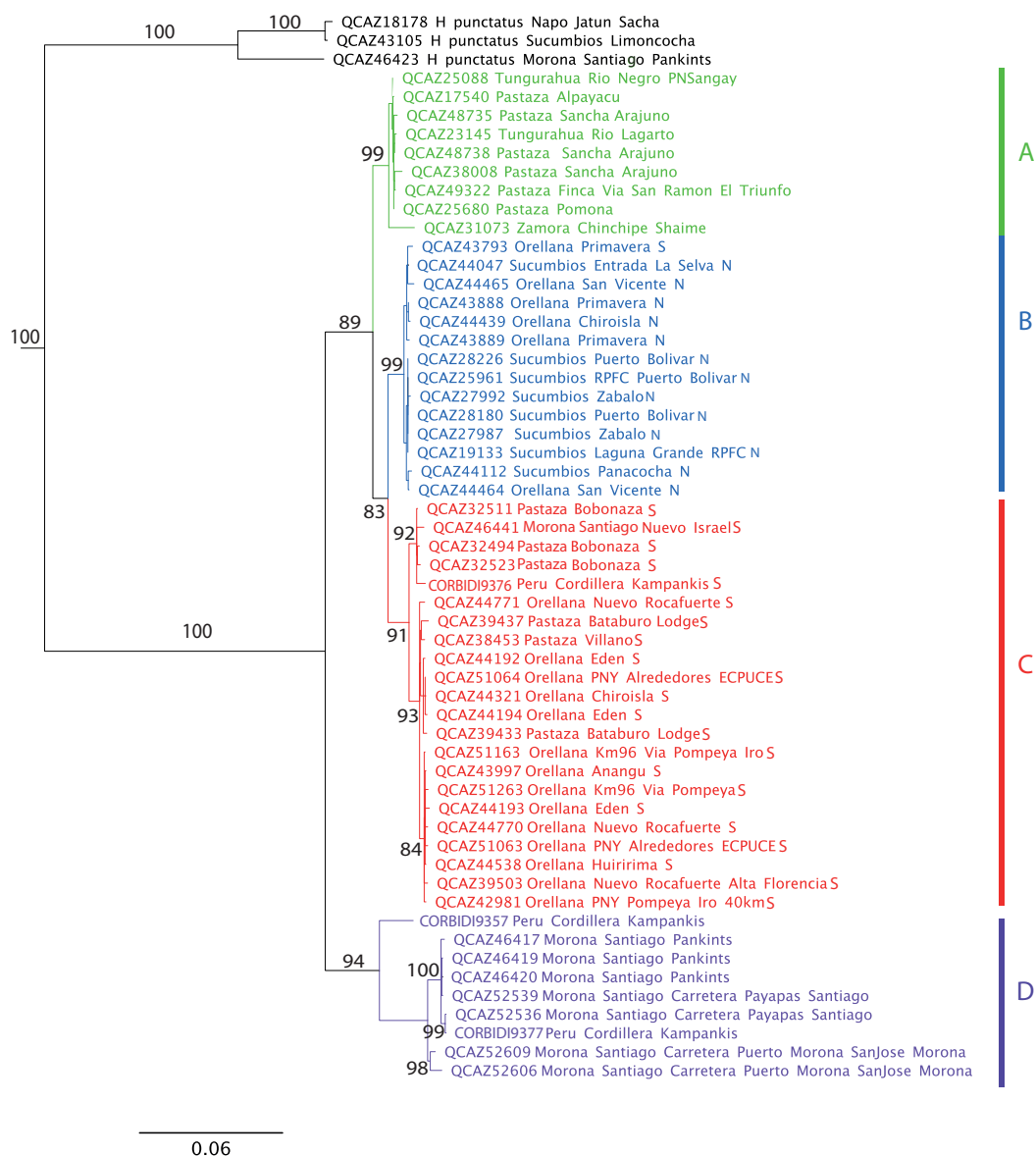
**Figura 1.** Mapa de las localidades muestreadas en este estudio.



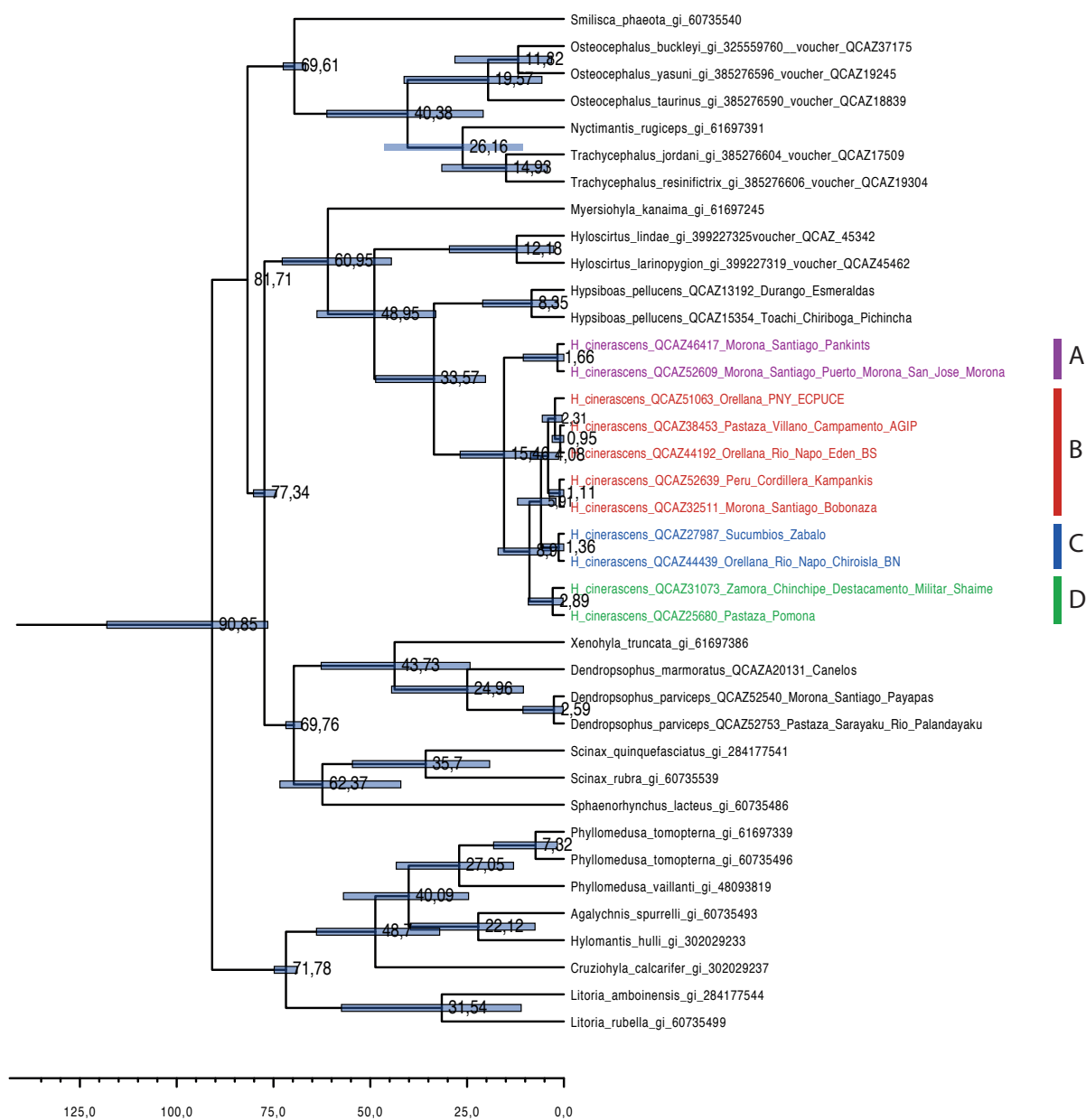
**Figura 2.** Mapa de localidades de los especímenes secuenciados en este estudio. Los colores corresponden a los clados de las filogenias obtenidas en este estudio (Figuras 3 y 4). Se muestran los principales ríos de la Amazonía ecuatoriana. La ubicación precisa de los especímenes de la Cordillera de Kampankis todavía tiene que ser verificada.



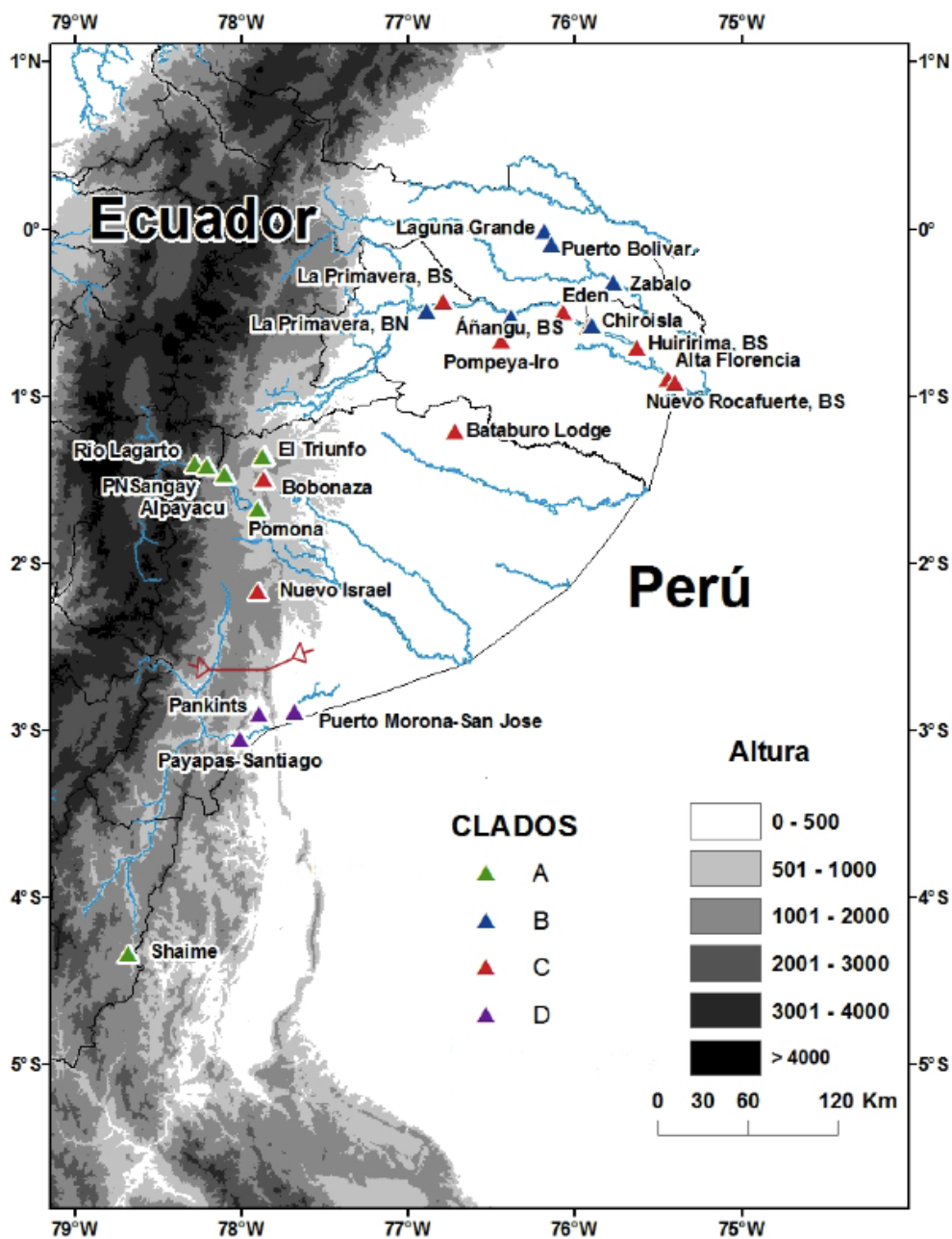
**Figura 3.** Filograma consenso resultante del análisis bajo el criterio de Inferencia Bayesiana de los genes combinados 12S, ND1 y CO1 de *Hypsiboas cinerascens* e *H. punctatus*. Se muestra el número de museo de cada individuo y su localidad. Los colores representan los diferentes clados (A, B, C y D y el grupo externo). Las probabilidades posteriores resultantes de las búsquedas Bayesianas aparecen en las ramas. No se muestra el grupo externo *Hypsiboas pellucens*.



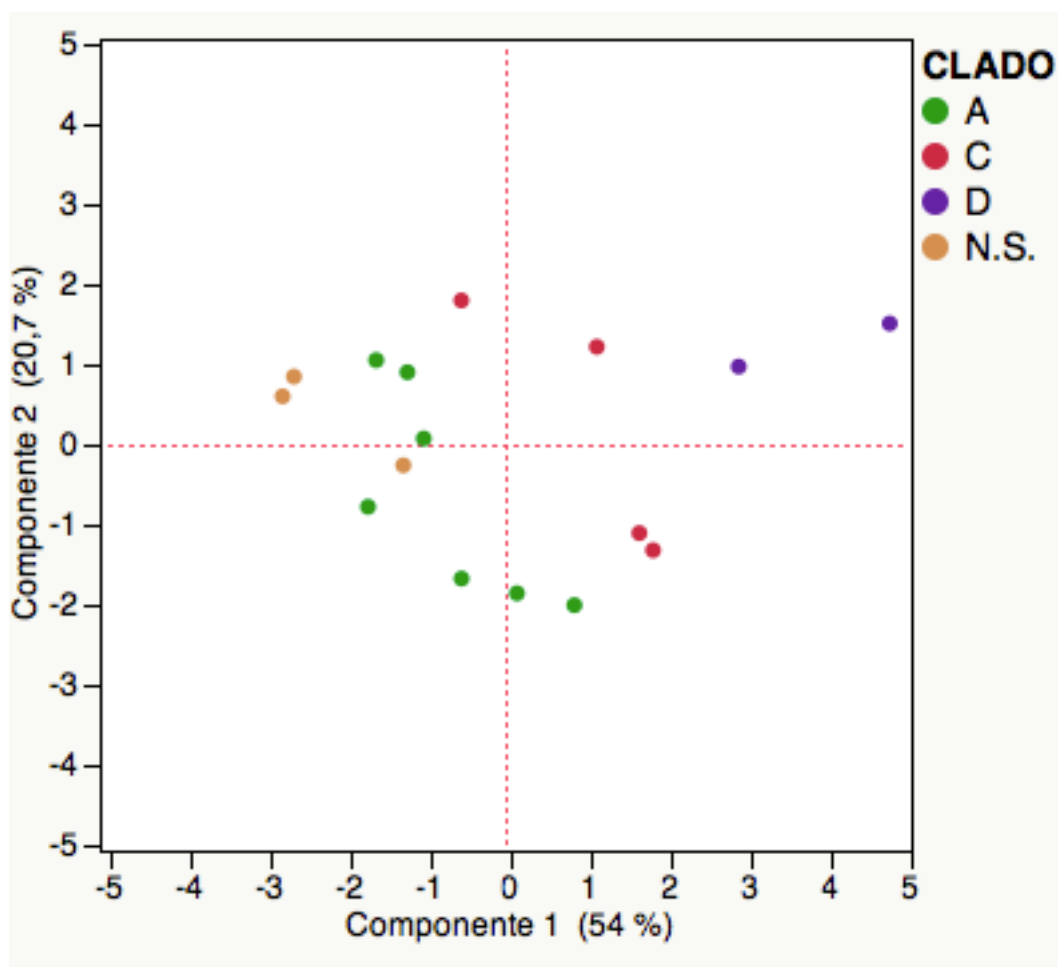
**Figura 4.** Árbol filogenético producto del análisis de Máxima Verosimilitud para los genes 12S, ND1 y CO1. Se muestran los números QCAZ para cada espécimen. Se detallan los valores de bootstraps mayores a 75 en cada rama. Se muestra el QCAZ de cada individuo y su localidad.



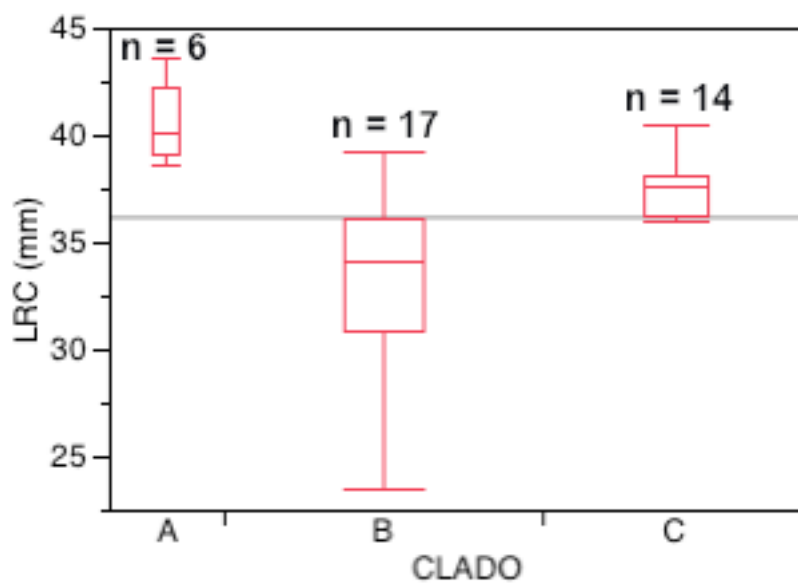
**Figura 5.** Árbol filogenético del Análisis Bayesiano que estima el tiempo de divergencia entre clados. Los colores representan a los clados resultantes de los análisis filogenéticos: clado A en verde, clado B en azul, clado C en rojo y clado D en morado. Los números en los nodos representan el tiempo de divergencia en millones de años.



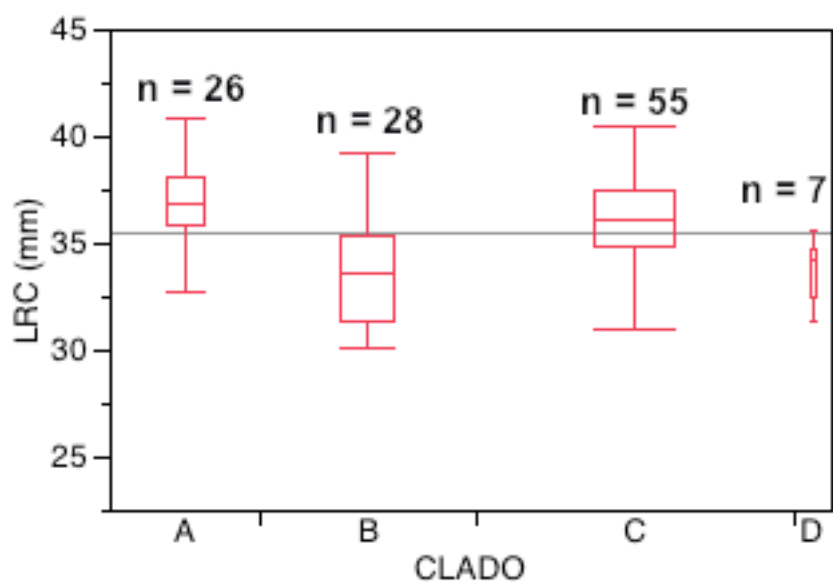
**Figura 6.** Mapa resultante del análisis de barreras geográficas. Se presenta la barrera encontrada (línea roja), así como las localidades empleadas en este estudio. Los colores representan los diferentes clados (clado A: verde, clado B: azul, clado C: rojo, clado D: morado).



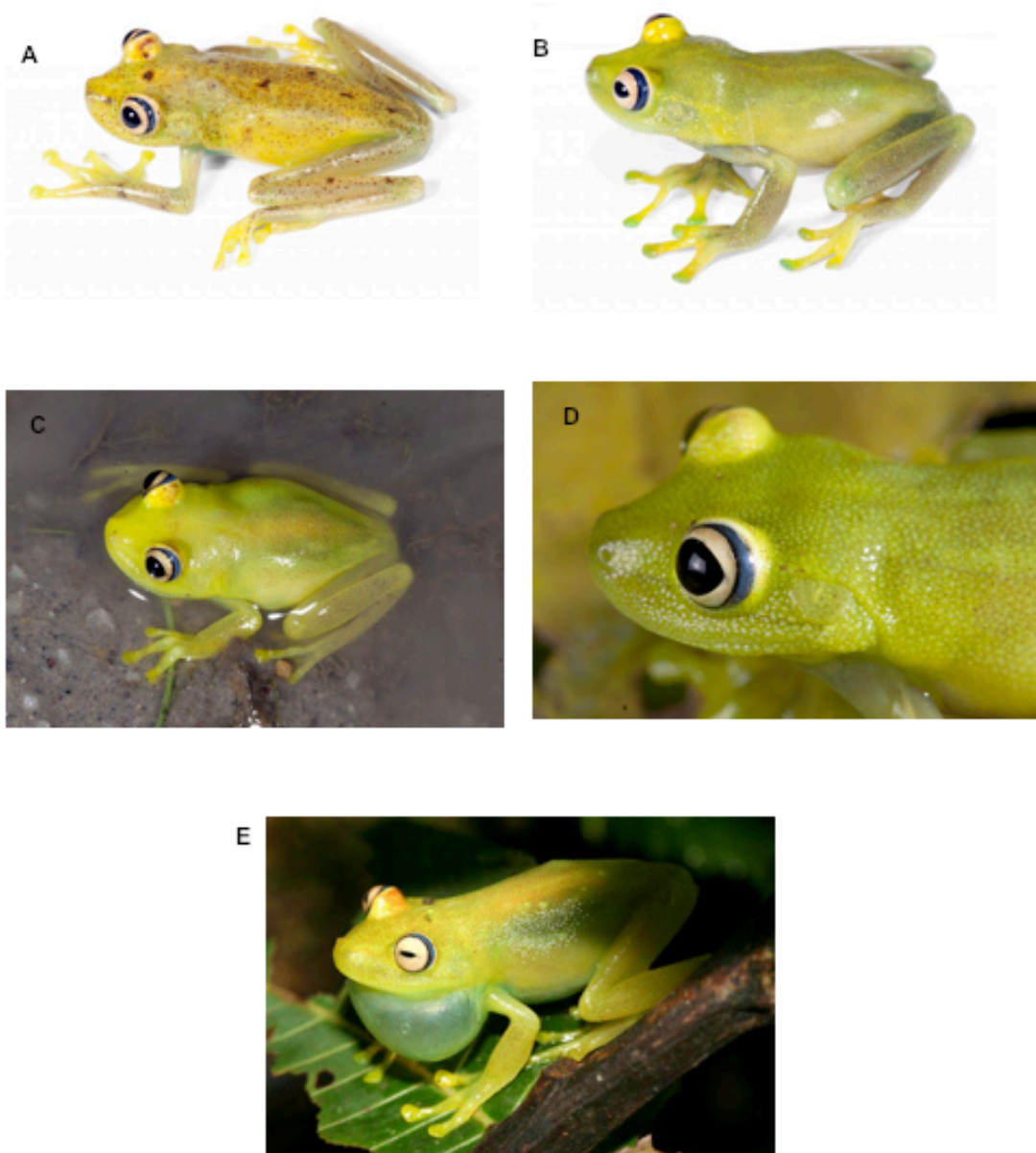
**Figura 7.** Proyección de las variables acústicas sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales pertenecientes al complejo de especies *Hypsiboas cinerascens*.



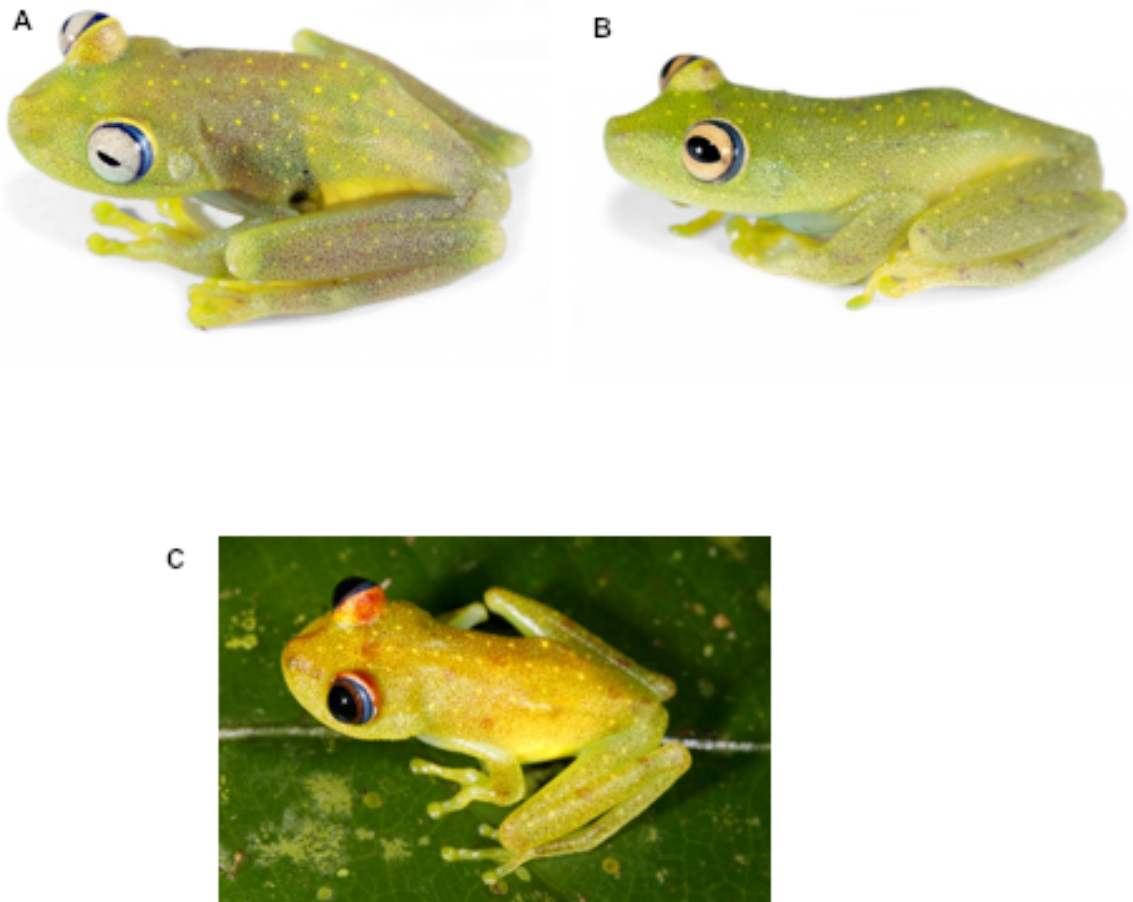
**Figura 8.** Diagrama de caja que compara la longitud rostro cloacal (LRC) en hembras del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens* entre los clados A, B y C. Se muestra la mediana (línea central de cada caja), la variación de los datos (rango intercuartil: longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).



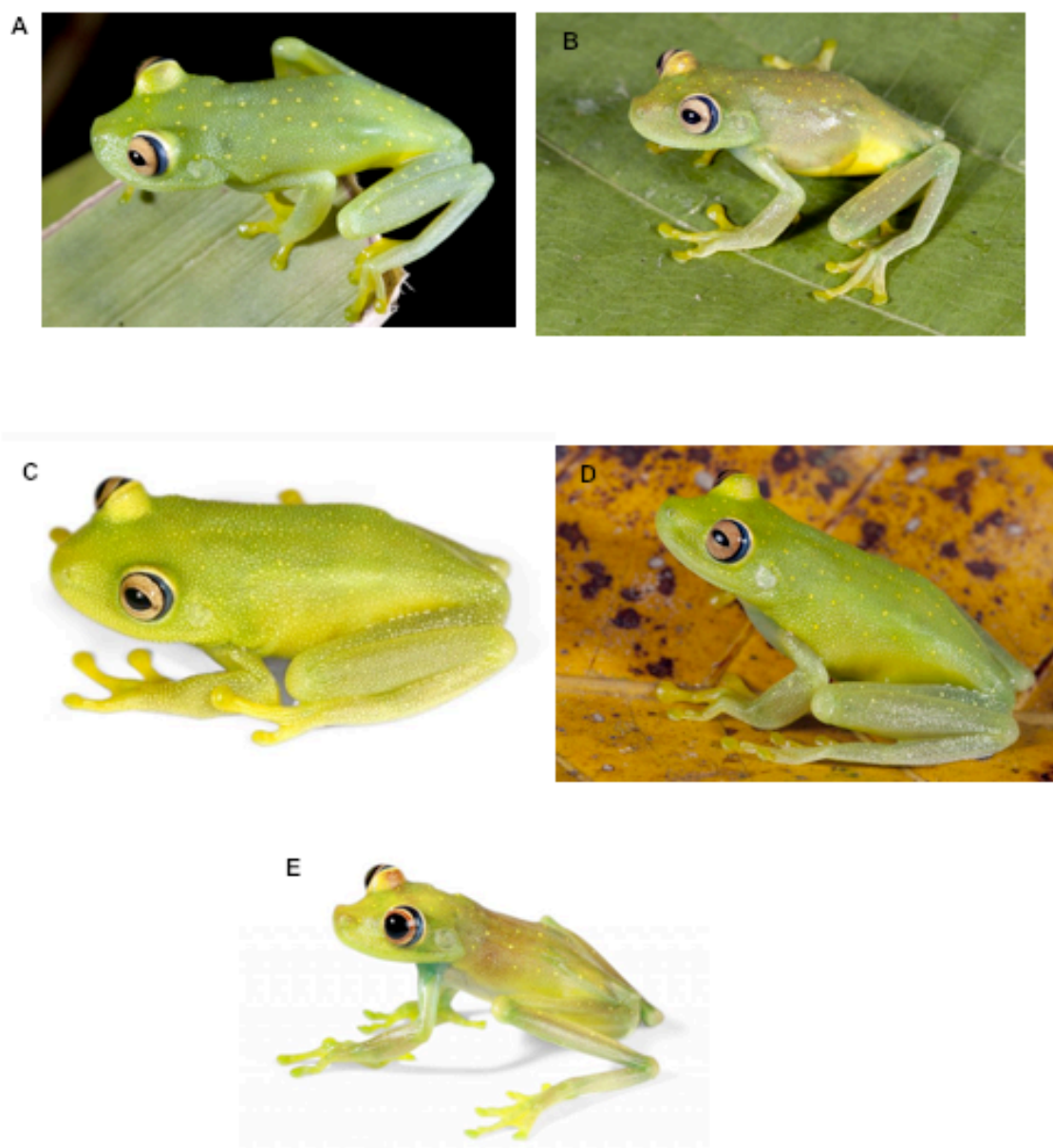
**Figura 9.** Diagrama de caja que compara la longitud rostro cloacal (LRC) en machos del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens* entre los diferentes clados. Se muestra la mediana (línea central de cada caja), la variación de los datos (rango intercuartil: longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).



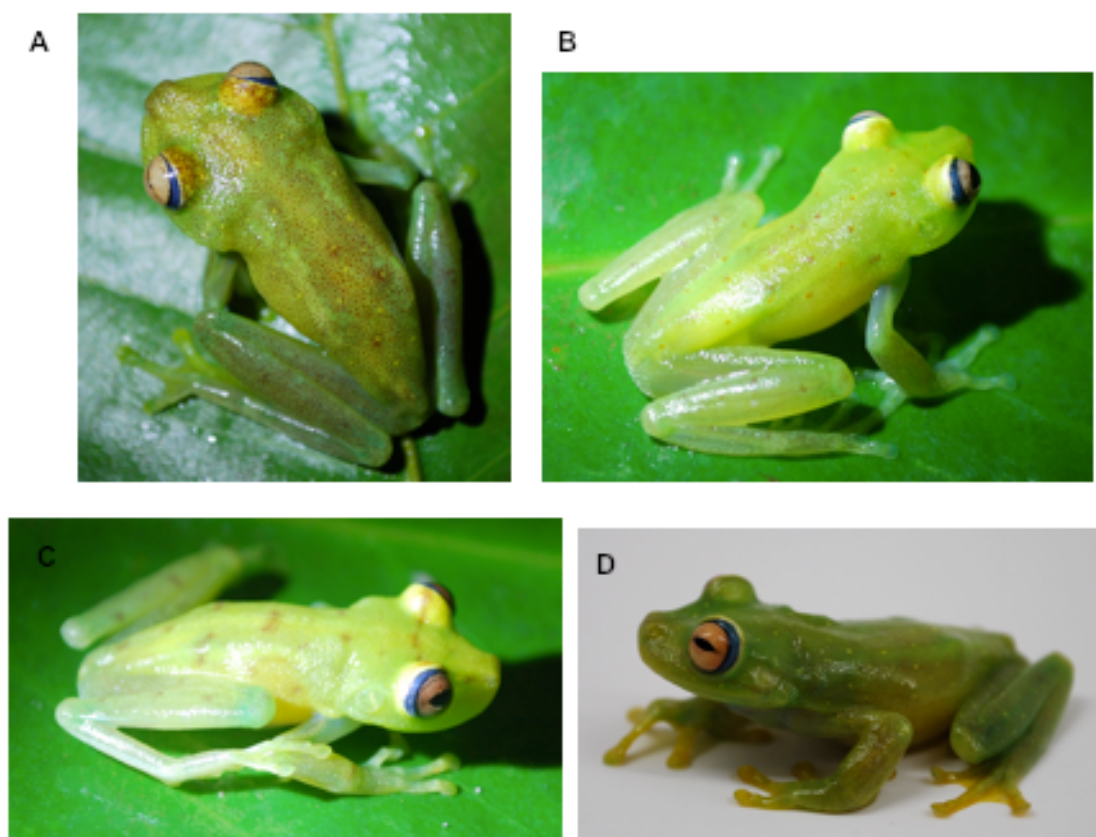
**Figura 10.** Fotografías de individuos pertenecientes al Clado A del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens*. (A) Río Negro (Provincia de Tungurahua), (B) Río Negro (Provincia de Tungurahua), (C) Zanzarajuno (Provincia de Pastaza), (D) Zanzarajuno (Provincia de Pastaza), (E) Pucayacu (Provincia de Pastaza).



**Figura 11.** Fotografías de individuos pertenecientes al Clado B del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens*. (A) Río Napo (Banco Norte, Provincia de Sucumbíos), (B) Laguna Grande (RPFC, Provincia de Sucumbíos), (C) Tarapoa (Provincia de Sucumbíos).



**Figura 12.** Fotografías de individuos pertenecientes al Clado C del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens*. (A) Pompeya (Provincia de Orellana), (B) Pompeya (Provincia de Orellana), (C) PNY (Provincia de Orellana), (D) Parque Nacional Yasuní (Provincia de Orellana), (E) Nuevo Rocafuerte (Banco Sur, Provincia de Orellana).



**Figura 13.** Fotografías de individuos pertenecientes al Clado D del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens*. (A y B) Santiago, (C y D) Puerto Morona (Provincia de Morona Santiago).

## 10. TABLAS

**Tabla 1.** Regiones de ADN y cebadores empleados en este estudio.

Gen	Cebadores	Secuencias 5'-3'	Fuente	Dirección
12S Mitochondrial	MVZ50	TCTCGGTGTAAGCGAGAGGCTT	Graybeal, 1997	Derecha
	MVZ59	ATAGCACTGAAAAYGCTDAGATG	Graybeal, 1997	Reversa
ND1 Mitochondrial	WL384	GAGATWGTTTGWGCAACTGCTCG	Moen y Wiens 2008	Derecha
	WL379	GCAATAATYATYTGAACMCC	Moen y Wiens 2008	Reversa
16S_frog tMET_frog	16S_frog	TTACCCTRGGGATAACAGCGCAA	Wiens <i>et al.</i> , 2005	Derecha
	tMET_frog	TTGGGGTATGGGCCCAAAGCT	Wiens <i>et al.</i> , 2005	Reversa
CO1 Mitochondrial	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994	Derecha
	dgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAR	Folmer <i>et al.</i> , 1994	Reversa

**Tabla 2.** Descripción de las variables temporales obtenidas del análisis de los cantos de anuncio del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens* (en base a Caminer, 2010).

<b>Simbología</b>	<b>Variable</b>	<b>Unidad</b>	
DC	Duración del canto	S	Medición física del canto, tiempo desde el comienzo de la primera nota hasta el final de la última
Nl	Notas por llamado	U	Número de notas por canto
Tsl	Tiempo de subida del canto	Hz	Duración desde el inicio del canto hasta el pico de mayor energía en la nota
Fdl	Frecuencia dominante del canto	Hz	Frecuencia con la mayor energía, medida a lo largo de todo el canto
Ffl	Frecuencia fundamental del canto	Hz	Frecuencia con la mayor energía en la primera armónica, medida a lo largo de todo el canto

**Tabla 3.** Modelos de evolución seleccionados para cada partición en los análisis filogenéticos. Se presentan los modelos para cada partición para los genes 12S, ND1 y COI.

Gen	Posición en el codón	Modelo de Evolución	Frecuencia			
			A	T	G	C
12S		GTR+G	0,3191	0,257	0,1916	0,2323
ND1	1	SYM+G	0,2858	0,2398	0,2167	0,2577
	2	GTR+G	0,1668	0,4189	0,1109	0,3035
	3	GTR+I+G	0,3777	0,3204	0,0443	0,2576
COI	1	SYM+I	0,257	0,2142	0,306	0,2227
	2	F81	0,1488	0,4049	0,1488	0,2975
	3	GTR+G	0,3229	0,3548	0,00706	0,2516

**Tabla 4.** Factor Bayes para las diferentes estrategias de partición (EP1, EP2 y EP3). EP1: ocho particiones: (1) gen 12S, (2) primera posición para los codones de ND1, (3) segunda posición para los codones de ND1, (4) tercera posición para los codones de ND1, (5) tRNA, (6) primera posición para los codones de CO1, (7) segunda posición para los codones de CO1, (8) tercera posición para los codones de CO1. EP2: tres particiones: (1) 12S, (2) ND1 y (3) COI. EP3: una sola partición. Se detallan los valores obtenidos para cada comparación entre las diferentes estrategias de partición.

	<b>EP1</b>	<b>EP2</b>	<b>EP3</b>	<b>EP1</b>	<b>EP2</b>	<b>EP3</b>
<b>EP1</b>	–	-60,05	-380,598	0,91	-59,538	-390,767
<b>EP2</b>	60,05	–	-320,548	60,96	0,512	-330,717
<b>EP3</b>	380,598	320,548	–	381,509	321,06	-10,168
<b>EP1</b>	-0,91	-60,96	-381,509	–	-60,448	-391,677
<b>EP2</b>	59,538	-0,512	-321,06	60,448	–	-331,229
<b>EP3</b>	390,767	330,717	10,168	391,677	331,229	–

**Tabla 5.** Características de los cantos de anuncio para tres clados del complejo de especies *Hypsiboas cinerascens*. Se muestra el promedio, la desviación estándar, rango y el número de individuos analizados (n) para cada variable.

<b>Variabes</b>	<b>Clado A (n=7)</b>	<b>Clado C (n=4)</b>	<b>Clado D (n=2)</b>
<b>Duración del llamado (s)</b>	0,38 ± 0,074 (0,31–0,46)	0,31 ± 0,12 (0,18–0,43)	0,31 ± 0,077 (0,24–0,39)
<b>Notas por llamado</b>	2–3	2–4	2–4
<b>Tiempo de subida (s)</b>	0,19 ± 0,037 (0,16–0,23)	0,15 ± 0,062 (0,090–0,22)	0,16 ± 0,040 (0,12–0,20)
<b>Frecuencia dominante del llamado (Hz)</b>	1686,15 ± 37,58 (1648,57–1723,73)	1791,67 ± 47,83 (1743,84–1839,50)	1761,22 ± 200,80 (1560,41–1962,02)
<b>Frecuencia fundamental del llamado (Hz)</b>	1686,15 ± 37,58 (1648,57–1723,73)	1791,67 ± 47,83 (1743,84–1839,50)	1761,22 ± 200,80 (1560,41–1962,02)
<b>Frecuencia de la segunda armónica (Hz)</b>	3044,19 ± 102,58 (2941,61–3146,77)	3277,86 ± 80,70 (3197,16–3358,56)	3267,72 ± 398,58 (2869,14–3666,30)
<b>Tiempo entre notas (s)</b>	0,1107 ± 0,014 (0,096–0,125)	0,08635 ± 0,0046 (0,0818–0,090)	0,123 ± 0,0010 (0,123–0,125)

**Tabla 6.** Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) para ocho variables que indica el porcentaje de la variación aportado por cada componente para los cantos de anuncio de individuos del complejo de especies de *Hypsiboas cinerascens*. El CP I (54,018 %) tiene cargas mayores en la frecuencia de la segunda armónica y las frecuencias fundamental y dominante. El CP II (20,721 %) tiene cargas mayores en las mismas frecuencias pero también en la duración del llamado y el tiempo de subida. El CP III (17,666 %) tiene las mismas cargas mayores que el CP2 con excepción de la frecuencia de la segunda armónica.

<b>Variables</b>	<b>CPI</b>	<b>CP II</b>	<b>CP III</b>
<b>Tiempo de subida</b>	-0,37453	0,27256	0,41476
<b>Duración del llamado</b>	-0,37158	0,28219	0,41477
<b>Frecuencia fundamental</b>	0,40865	0,37859	0,13894
<b>Frecuencia dominante</b>	0,40865	0,37859	0,13894
<b>Frecuencia la segunda armónica</b>	0,41592	0,35875	0,02245
<b>Notas por llamado</b>	-0,37988	0,36514	0,05239
<b>Tiempo entre notas</b>	0,13939	-0,51357	0,48639
<b>Tiempo entre cantos</b>	-0,22569	0,1834	-0,61442
<b>Eigenvalue</b>	4,3214	1,6577	1,4133
<b>Porcentaje de varianza</b>	54,018	20,721	17,666

**Tabla 7.** Resultados de la prueba de t realizada a los componentes principales encontrados en el análisis de componentes principales entre los diferentes clados. Se incluyen los p-values, el valor de t y los grados de libertad.

<b>CP</b>	<b>CLADOS</b>	<b>p-Value</b>	<b>t</b>	<b>GL</b>
<b>I</b>	D-NS	<0,0001	2,17881	15
	D-A	0,0001		
	C-NS	0,0011		
	D-C	0,007		
	C-A	0,0165		
	A-NS	0,0515		
<b>II</b>	D-A	0,088	2,17881	15
	D-C	0,3304		
	NS-A	0,2632		
	D-NS	0,4714		
	C-A	0,3492		
	NS-C	0,7982		
<b>III</b>	A-NS	0,0073	2,17881	15
	C-NS	0,0409		
	A-D	0,1218		
	D-NS	0,3488		
	C-D	0,3409		
	A-C	0,4621		

**Tabla 8.** Estadísticos descriptivos para las medidas, en cm, de la longitud rostro-cloacal de machos y hembras para cada clado. Se detalla el tamaño de muestra (n), la media y la desviación estándar.

		<b>Total</b>	<b>Clado A</b>	<b>Clado B</b>	<b>Clado C</b>	<b>Clado D</b>
<b>Machos</b>	<b>n</b>	116	26	28	55	7
	<b>Media</b>	35,2179	36,3828	33,1632	35,9077	33,6895
	<b>Desviación estándar</b>	2,4732	1,3896	2,61	2,2025	1,4841
	<b>Rango</b>	32,7447–37,6911	34,9932–37,7724	30,5532–35,7732	33,7052–38,1102	32,2054–35,1736
<b>Hembras</b>	<b>n</b>	37	6	17	14	
	<b>Media</b>	36,1698	40,6022	33,4545	37,5674	
	<b>Desviación estándar</b>	4,2427	1,879	4,3609	2,0667	
	<b>Rango</b>	31,9271–40,4125	38,7232–42,4812	29,0936–37,8154	35,5007–39,6341	

**Tabla 9.** Resultados de la prueba de comparaciones utilizando la prueba de Wilcoxon para los LRC de machos y hembras entre los diferentes clados.

	<b>Comparaciones entre clados</b>	<b>Valor <i>P</i></b>	<b>Estadístico de Wilcoxon (z)</b>
<b>Machos</b>	C-B	< 0,001	4,45456
	D-B	0,578	0,55677
	C-A	0,138	-1,48203
	D-A	0,0008	-3,36881
	D-C	0,008	-2,6469
	B-A	< 0,001	-4,67438
	<b>Hembras</b>	C-B	0,004
C-A		0,006	-2,76407
B-A		0,0007	-3,39568

**Tabla 10.** Descripción de caracteres morfológicos cualitativos para los diferentes clados.

<b>Caracteres</b>	<b>Clado A</b>	<b>Clado B</b>	<b>Clado C</b>	<b>Clado D</b>
<b>Coloración del dorso</b>	Verde-verde amarillenta	Verde claro- verde amarillenta	Verde claro	Verde claro- verde amarillenta
<b>Presencia/Ausencia de puntos amarillos en el dorso</b>	Ausencia de puntos amarillos	Presencia de puntos amarillos	Presencia de puntos amarillos bien marcados	Presencia de puntos amarillos
<b>Presencia/Ausencia de puntos rojos en el dorso</b>	Presencia de pequeños puntos rojos	Presencia de pequeños puntos rojos	Ausencia de puntos rojos	Presencia de abundantes puntos rojos
<b>Presencia/Ausencia de puntos en patas</b>	Presencia de pequeños puntos rojos	Presencia de pequeños puntos rojos	Presencia de puntos amarillos	Presencia de puntos amarillos y rojos

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Lista de individuos analizados en el estudio. Se muestra el número de museo (QCAZ o CORBIDI), la localidad, coordenadas y provincia donde fueron colectados, y el clado al cual pertenecen.

<b>QCAZ</b>	<b>Localidad</b>	<b>Provincia</b>	<b>Coordenadas</b>		<b>Clados</b>
17540	Río Alpayacu	Pastaza	1,4674°S	78,1034°O	A
19133	Laguna Grande, RPFC	Sucumbíos	0,0096°S	76,1818°O	B
23145	Baños-Río Lagarto	Tungurahua	1,4003°S	78,2842°O	A
25088	PNSangay	Tungurahua	1,4143°S	78,2071°O	A
25680	Pomona	Pastaza	1,6754°S	77,9035°O	A
27987	Zabalo	Sucumbíos	0,3181°S	75,7663°O	B
28180	Puerto Bolívar	Sucumbíos	0,0886°S	76,1420°O	B
31073	Destacamento Militar Shaime	Zamora Chinchipe	4,3312°S	78,6801°O	A
32523	Bobonaza	Pastaza	1,4945°S	77,8697°O	C
39437	Bataburo Lodge	Pastaza	1,2083°S	76,7167°O	C
39503	Nuevo Rocafuerte, Alta Florencia	Orellana	0,8958°S	75,4377°O	C

**Anexo 1. Continuación**

<b>QCAZ</b>	<b>Localidad</b>	<b>Provincia</b>	<b>Coordenadas</b>		<b>Clados</b>
42981	Parque Nacional Yasuní, Vía Pompeya–Iro km 40	Orellana	0,6670°S	76,4423°O	C
43793	La Primavera	Orellana	0,4442°S	76,7868°O	B
43889	La Primavera	Orellana	0,431°S	76,7864°O	C
43997	Áñangu	Orellana	0,5249°S	76,3844°O	B
44047	Entrada a la selva Lodge	Sucumbíos	0,5249°S	76,3844°O	B
44112	2,5 km en línea recta al sur de Pañacocha	Sucumbíos	0,4713°S	76,0665°O	B
44192	Río Napo, Eden, Banco sur	Orellana	0,4983°S	76,0711°O	C
44321	Chiroisla	Orellana	0,5799°S	75,9179°O	C
44439	Chiroisla	Orellana	0,5753°S	75,8999°O	B
44464	San Vicente	Orellana	0,4877°S	76,8899°O	B

**Anexo 1.** Continuación

<b>QCAZ</b>	<b>Localidad</b>	<b>Provincia</b>	<b>Coordenadas</b>		<b>Clados</b>
44538	Huiririma	Orellana	0,7116°S	75,6239°O	C
44770	Nuevo Rocafuerte	Orellana	0,9191°S	75,4011°O	C
46417	Pankints	Morona Santiago	1,9335°S	77,9053°O	D
46441	Nuevo Israel	Morona Santiago	2,1650°S	77,9029°O	C
48735	San Ramón–El Triunfo	Pastaza	1,3548°S	77,8643°O	A
49322	Finca Pucayacu	Pastaza	1,3572°S	77,8705°O	A
52536	Carretera Payapas–Santiago	Morona Santiago	3,0465°S	78,0129°O	D
52606	Carretera Puerto Morona–San Jose de Morona	Morona Santiago	2,8861°S	77,6786°O	D
CORBIDI9376	Cordillera de Kampankis	Loreto (Perú)	3,8409°S	77,6385°O	D
CORBIDI9377	Cordillera de Kampankis	Loreto (Perú)	3,8409°S	77,6385°O	C

**Anexo 2.** Protocolos de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes 12S, ND1 y CO1.

<b>Gen</b>	<b>Protocolo</b>
	1 ciclo: 2 min 94°C, 30s 42°C, 1min 72°C
	9 ciclos: 30s 94°C, 30s 42°C, 1min 72°C
12S	
Mitocondrial	30 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 5min 72°C
	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	10 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
CO1	
Mitocondrial	29 ciclos: 30s 94°C, 30s 57°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 5min 72°C

**Anexo 2.** Continuación

<b>Gen</b>	<b>Protocolo</b>
	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	10 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
ND1	
Mitocondrial	29 ciclos: 30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 5min 72°C
	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
	5 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C
ND1	
Mitocondrial	22 ciclos: 30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C
	1 ciclo: 10min 72°C

### **Anexo 3.** Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guandina

#### MÉTODOLÓGÍA

##### A. Lisis celular

1. Calentar la solución de lisis a 55°C hasta que el precipitado vuelva a estar en solución.
2. Colocar 10 mg de tejido macerado en un tubo de 1.5ml que contenga 300µl de la solución de lisis de células.
3. Añadir 3–5µl de proteinasa K (20mg/ml), dar un vórtex rápido e incubar de 3–6 horas (dejarlo durante toda la noche si fuera necesario) a 55°C hasta que el tejido se haya digerido.
4. Durante el proceso de lisis, las muestras deben ser agitadas por lo menos cada 30 minutos.
5. Dar un vórtex suave para homogenizar.
6. Enfriar las muestras a temperatura ambiente.

##### B. Precipitación proteica

1. Añadir 100µl de Solución de precipitación de proteínas en cada tubo con células lisadas y dar un vórtex de 10–20 segundos para mezclar el contenido.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
3. Trasladar el sobrenadante, que contiene ADN a un tubo nuevo de 1.5ml previamente rotulado. El pellet formado en el fondo del tubo contiene proteínas y es descartado.

##### C. Precipitación de ADN

1. Añadir 300µl de Isopropanol frío (-20°C) y mezclarlo invirtiendo el tubo varias veces.
2. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el pellet, que en este caso contiene el ADN.

4. Añadir 300µl de etanol 70% e invertir varias veces el tubo para lavar el pellet de ADN.
5. Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos.
6. Descartar una vez más el sobrenadante.
7. Para evitar los residuos de etanol en el tubo, dejarlo con la tapa abierta durante una hora aproximadamente de manera que se evapore, teniendo cuidado de que el pellet no se deshidrate demasiado.

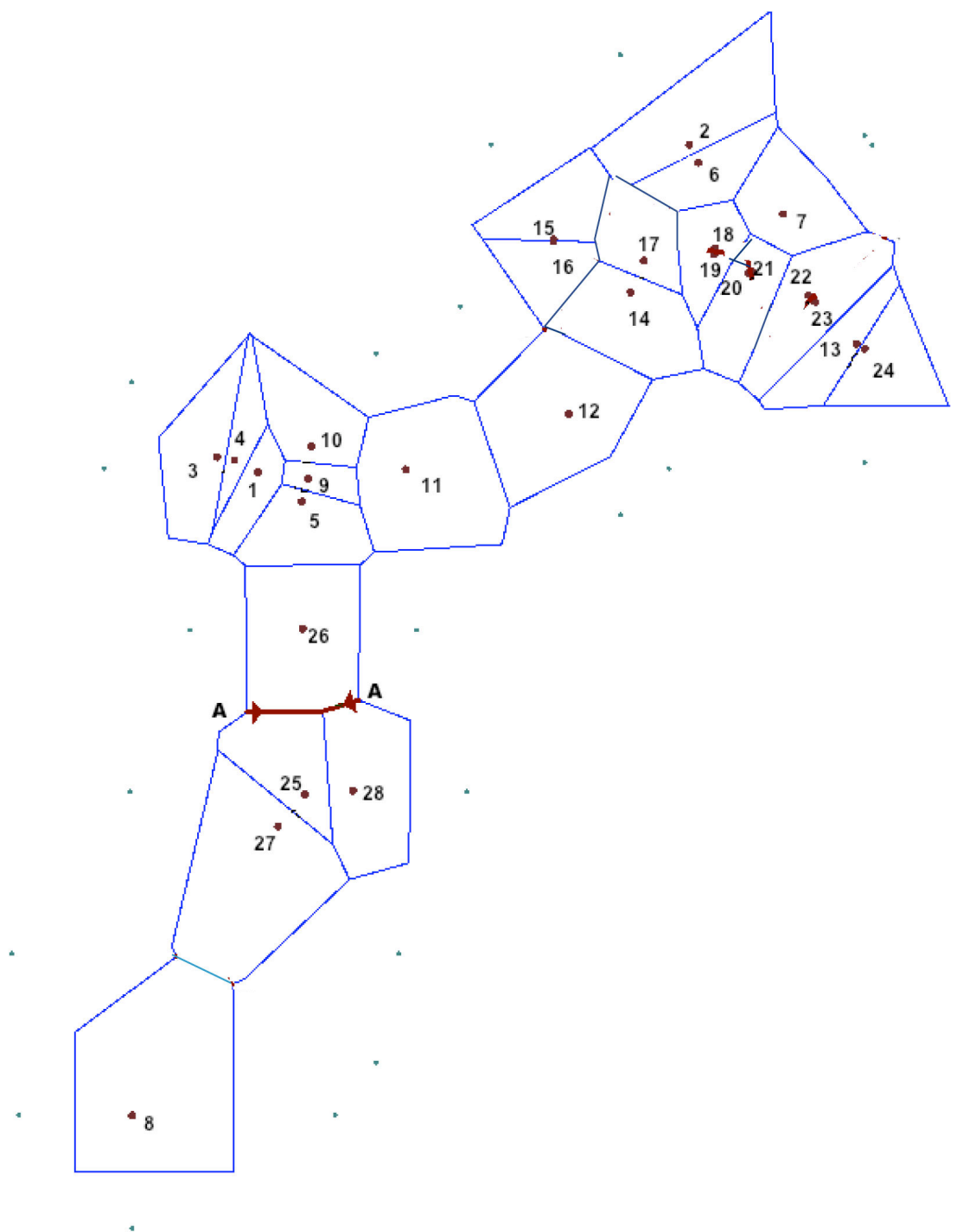
#### D. Hidratación de ADN y almacenamiento

1. Añadir 50µl de 10mM TrisCl, pH 8.0, Resuspender el ADN dando golpes suaves a la base del tubo.
2. Almacenar hasta el día siguiente a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Anexo 4.** Lista de localidades empleadas en el análisis de barreras geográficas. Se detalla el número QCAZ de los individuos, la localidad donde fueron colectados y las coordenadas geográficas.

<b>QCAZ</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
17540	Alpayacu	1,4674°S	78,1034°O
19133	Laguna Grande RPFC	0,0097°S	76,1816°O
23145	Banos Río Lagarto	1,4002°S	78,2842°O
25088	PNSangay	1,4142°S	78,2071°O
25680	Pomona	1,6000°S	77,9072°O
27987	Zabalo	0,3181°S	75,7662°O
28180	RPFC	0,0886°S	76,1420°O
31073	Shaime	4,3327°S	78,6629°O
32523	Bobonaza	1,4980°S	77,8793°O
38453	Villano	1,4570°S	77,4433°O
39437	Bataburo Lodge	1,2083°S	76,7166°O
39503	Nuevo Rocafuerte Alta Florencia	0,8966°S	75,4370°O
42981	PNY Pompeya-Iro KM40	0,6670°S	76,4423°O
43793	La Primavera BS	0,4442°S	76,7868°O
43889	La Primavera BN	0,4310°S	76,7864°O
43997	Anangu BS	0,5249°S	76,3844°O
44112	Panacocha BN	0,4712°S	76,0667°O
44192	Eden BS	0,4983°S	76,0711°O
44321	Chiroisla BS	0,5799°S	75,9176°O
44439	Chiroisla BN	0,5756°S	75,8999°O
44464	San Vicente BN	0,6790°S	75,6511°O
44538	Huiririma BS	0,7116°S	75,6239°O
44770	Nuevo Rocafuerte BS	0,9192°S	75,4010°O
46417	Pankints	2,9019°S	77,8940°O
46441	Nuevo Israel	2,1650°S	77,9029°O
48735	San Ramon El Triunfo	1,3533°S	77,8645°O
52536	Payapas-Santiago	3,0465°S	78,0129°O
52606	Puerto Morona	2,8861°S	77,6786°O

**Anexo 5.** Mapa resultante del análisis de barreras geográficas. Se muestra el resultado de la triangulación Dealaunay con puntos arbitrarios (en celeste). Los puntos rojos representan las localidades secuenciadas. Se presenta la barrera encontrada en rojo.



**Anexo 6.** Fragmentos secuenciados por cada individuo dentro del estudio

<b>QCAZ</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>PROVINCIA</b>	<b>12S</b>	<b>COI</b>	<b>ND1</b>
16770	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
17540	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
19133	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbíos	X	X	X
23145	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Tungurahua	X	X	X
25088	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Tungurahua	X	X	X
25680	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
25961	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbíos	X	X	X
27987	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbíos	X	X	X
27992	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbíos	X	X	X
28180	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbíos	X	X	X
28226	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbíos	X	X	X
31073	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Zamora Chinchipe	X	X	X
32494	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
32511	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
32523	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
38008	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
38453	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
39433	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
39437	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
39503	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X

## Anexo 6. Continuación

<b>QCAZ</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>PROVINCIA</b>	<b>12S</b>	<b>COI</b>	<b>ND1</b>
42981	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
43793	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
43888	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
43889	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
43997	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44047	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbios	X	X	X
44112	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Sucumbios	X	X	X
44192	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44193	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44194	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44321	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44439	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44464	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44465	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44538	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44770	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
44771	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
46417	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
46419	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
46420	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
46441	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X

## Anexo 6. Continuación

<b>QCAZ</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>PROVINCIA</b>	<b>12S</b>	<b>COI</b>	<b>ND1</b>
48735	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
48738	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
49322	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Pastaza	X	X	X
51063	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
51064	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
51163	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
51263	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Orellana	X	X	X
52536	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
52539	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
52606	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
52609	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Morona Santiago	X	X	X
52637	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Loreto (Perú)	X	X	X
52639	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Loreto (Perú)	X	X	X
52640	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Loreto (Perú)	X	X	X

**Anexo 7.** Datos de los individuos utilizados en el análisis de los cantos de anuncio. Se muestra el número QCAZ, la localidad donde fue colectado, la temperatura (I: si fue tomada del individuo; A: si fue tomada del aire) y la longitud rostro cloacal.

<b>QCAZ</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>LRC</b>
8148	Via Tivacuno	-	35,9767
41713	Jempekat	21,6 (A)	-
41714	Jempekat	21,6 (A)	-
48735	Zanjarajuno	21,4 (I)	37,63
48736	Zanjarajuno	17,2 (I)	37,4167
48737	Zanjarajuno	18,3 (I)	34,4133
48738	Zanjarajuno	22 (I)	36,9067
51263	Km 96, Via Pompeya	23,2 (A)	37,3433
52539	Santiago	22 (A)	38,7
549,41	Río Negro	-	34,23
<b>CORBIDI</b>	<b>Kampankis</b>	-	-
Individuo no colectado 1	Km 96, Via Pompeya	22,8 (A)	-
Individuo no colectado 2	Km 96, Via Pompeya	22,2 (A)	-
Individuo no colectado 3	Rio Negro	-	-
Individuo no colectado 4	Rio Negro	-	-
Individuo no colectado 5	Santiago	21,8 (A)	-

## PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Daniela Pareja Mejía, C.I. 1712615044, autora del trabajo de graduación titulado: “Sistemática del complejo de especies de *Hypsiboas cinerascens* (Anura: Hylidae) en la Amazonía ecuatoriana” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 19 de abril del 2013

Srta. Daniela Pareja Mejía

CI 1712615044