

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Sistemática del género *Caecilia* (Gymnophiona: Caeciliidae) de la
vertiente del Pacífico de Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias
Biológicas**

THALÍA ELIZABETH ARROBA LÓPEZ

Quito, 2017

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Thalía Elizabeth Arroba López ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Santiago R. Ron, Ph. D
Director de la disertación

Quito, 12 de julio de 2017

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	VII
MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN.....	VIII
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
2. Materiales y métodos.....	13
2.1 <i>Declaración de Ética.....</i>	<i>13</i>
2.2 <i>Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....</i>	<i>14</i>
2.3 <i>Análisis filogenéticos.....</i>	<i>15</i>
2.4 <i>Análisis morfológicos.....</i>	<i>16</i>
2.4.1 <i>Caracteres diagnósticos.....</i>	<i>17</i>
2.4.2 <i>Caracteres morfométricos.....</i>	<i>17</i>
2.5 <i>Protocolo para la delimitación de especies.....</i>	<i>18</i>
3. Resultados.....	19
3.1 <i>Relaciones filogenéticas.....</i>	<i>19</i>
3.2 <i>Análisis morfológicos.....</i>	<i>20</i>
3.2.1 <i>Caracteres diagnósticos.....</i>	<i>20</i>

3.2.2 <i>Caracteres morfométricos</i>	21
3.3 <i>Tratamiento taxonómico</i>	21
4. Discusión	32
Agradecimientos	35
Referencias	37
Figuras	42
Tablas	54
Material Suplementario	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia del género <i>Caecilia</i> del Ecuador.....	43
Figura 2. Ejes I y II del Análisis de Componentes Principales basado en variables morfométricas	45
Figura 3. Holotipo <i>Caecilia carchense</i> sp. nov.....	46
Figura 4. Radiografías de los especímenes de la serie tipo de <i>Caecilia carchense</i> sp. nov.....	47
Figura 5. Variación de coloración en vida de <i>Caecilia carchense</i> sp. nov.....	48
Figura 6. Variación de coloración en etanol de <i>Caecilia carchense</i>	49
Figura 7. Variación de <i>Caecilia truncatus</i> sp. nov.....	50
Figura 8. Radiografías de <i>Caecilia truncatus</i> sp. nov.....	51
Figura 9. Coloración en vida de <i>Caecilia truncatus</i> sp. nov.....	52
Figura 10. Mapa de Distribución del género <i>Caecilia</i> del Ecuador.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cebadores empleados en el presente estudio para la amplificación y secuenciación de tres genes mitocondriales (<i>12S</i> , <i>16S</i> y <i>ND1</i>).....	55
Tabla 2. Distancias genéticas estimadas mediante el cálculo de la media no corregida para el gen <i>16S</i>	56
Tabla 3. Medidas morfométricas de los especímenes en la filogenia presentada en la Figura 1.....	57
Tabla 4. Caracteres diagnósticos del género <i>Caecilia</i> de la vertiente pacífica del Ecuador.....	58
Tabla 5. Cargas de nueve variables de un análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las especies del género <i>Caecilia</i> de la cuenca pacífica del Ecuador.....	59

LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Especímenes examinados pertenecientes al género <i>Caecilia</i> de la cuenca pacífica del Ecuador	61
Tabla S2. Medidas merísticas y morfométricas tomadas para los especímenes del género <i>Caecilia</i> de la cuenca pacífica del Ecuador utilizados en la filogenia.....	65

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN**Revista**

PLOSOne

Título

Sistemática del género *Caecilia* (Gymnophiona: Caeciliidae) de la vertiente del Pacífico de Ecuador

Autores

Thalía Arroba* y Santiago Ron

Correo electrónico

* tarroba952@puce.edu.ec

Dirección

Museo de Zoología, Escuela de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador,
Avenida 12 de Octubre y Roca, Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador

El presente trabajo se presenta en el formato de la revista PlosOne a partir de la siguiente página.

Sistemática del género *Caecilia* (Gymnophiona: Caeciliidae) de la vertiente del Pacífico de Ecuador

Thalía E. Arroba, Santiago R. Ron

Museo de Zoología, Escuela de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador,
Avenida 12 de Octubre y Roca, Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador

Palabras clave: Andes, filogenética, Neotrópico, nuevas especies, región Chocó, taxonomía

Resumen

La descripción de la mayoría de especies de cecílicos se ha hecho únicamente en base a caracteres morfológicos y, en su mayoría, en base a pocos especímenes. Revisiones taxonómicas en base a secuencias de ADN son numerosas entre los órdenes Anura y Urodela. Estos estudios han demostrado que la riqueza real de especies tropicales puede ser significativamente mayor a la descrita en base a caracteres morfológicos. Sin embargo, el uso de secuencias de ADN es casi inexistente en estudios de alfa-taxonomía de Gymnophiona neotropicales por lo que se desconoce su contenido de diversidad críptica. En este estudio utilizamos información genética y morfológica para elucidar las relaciones filogenéticas del género *Caecilia* en el Ecuador con énfasis en la cuenca pacífica. Secuenciamos los genes mitocondriales *12S*, *16S* y *ND1* y las secuencias obtenidas fueron complementadas con secuencias del GenBank. Las relaciones filogenéticas fueron inferidas mediante Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Además, se realizó una evaluación morfológica de los especímenes con caracteres cuantitativos y cualitativos. La filogenia presentó dos clados mayores conformados por especies tanto de la cuenca pacífica como de la cuenca amazónica. Para los especímenes del occidente se identificaron 13 especies candidatas con buen soporte, incrementando

la cantidad de especies reconocidas en esta región en un 260%. Mediante la integración de evidencia genética y morfológica se reconocieron nueve especies candidatas confirmadas. De ellas, una corresponde a *Caecilia buckleyi*, una especie válida previamente considerada un sinónimo junior de *Caecilia pachynema* y se describen dos especies nuevas.

Introducción

Los cecílicos son anfibios del orden Gymnophiona, uno de los tres órdenes de la clase Amphibia. Se caracterizan por la ausencia de extremidades y por su cuerpo vermiforme y anillado. Poseen órganos sensoriales accesorios en su cráneo gracias a los cuales se orientan bajo tierra. Exhiben una gran diversidad de modos reproductivos: oviparidad con larvas acuáticas, oviparidad con desarrollo directo y al menos dos formas de viviparidad. Sus hábitos son principalmente subterráneos, pueden ser acuáticos o semi-acuáticos; se los encuentra en una gran variedad de hábitats desde bosques lluviosos tropicales hasta bosques deciduos estacionales e incluso terrenos abiertos [1].

El orden Gymnophiona constituye el 3% de las especies de anfibios. Se conocen globalmente 205 especies y 10 familias: Rhinatrematidae, Ichthyophiidae, Scolecomorphidae, Chikilidae, Herpelidae, Typhlonectidae, Indotyphlidae, Dermophiidae, Siphonopidae y Caeciliidae [2].

La familia Caeciliidae tiene 42 especies [3], sin embargo su taxonomía es inestable y no ha sido esclarecida por completo. Varias especies han sido descritas en base a un solo espécimen y otras en base a series muy pequeñas [1], esto debido a los problemas que presenta su colección como consecuencia de sus hábitos fosoriales y que no existe una técnica de muestreo definida [4].

En Ecuador se han reportado 23 especies del orden Gymnophiona, de las cuales 14 pertenecen al género *Caecilia*. La mayoría de especies habitan la cuenca amazónica y solo cinco han sido reportadas en la cuenca pacífica [5]. La primera y única publicación sobre la taxonomía de las cecilias del Ecuador fue presentada por Taylor y Peters [6] en 1974. Fletcher-Lazo [7] en 2002 elaboró una tesis muy detallada sobre la taxonomía, distribución e historia natural de los cecílidos del occidente ecuatoriano, pero ese trabajo no fue publicado. Ninguna de las investigaciones mencionadas empleó herramientas moleculares para elucidar relaciones filogenéticas y límites de especies.

Las filogenias moleculares se basan en la selección, amplificación y secuenciación de segmentos de ADN y actualmente son necesarias para el esclarecimiento de las relaciones evolutivas; el tamaño del conjunto de datos es una fortaleza de los caracteres moleculares además de reducir la subjetividad en que incurre la codificación de los caracteres morfológicos [8].

Por la falta de estudios moleculares en la sistemática de Gymnophiona, la comprensión de sus relaciones filogenéticas y contenido de especies es todavía fragmentario. Al esclarecer las relaciones filogenéticas e identificar las especies de cecílidos que se encuentran en Ecuador, se pueden realizar estudios de distribución y ampliar el conocimiento científico que permita tomar medidas de conservación.

El declive de las poblaciones de anfibios es otro foco de atención. La mayor parte de datos disponibles sobre declinaciones de anfibios se centran en ranas y salamandras; una revisión realizada por Gower y Wilkinson [1] recopila las amenazas reportadas para Gymnophiona; una de las principales es la destrucción y fragmentación del hábitat. Además, algunos individuos son exterminados durante excavaciones de suelo para agricultura y muchos otros debido a que son confundidos con serpientes. Sin embargo,

uno de los mayores obstáculos para determinar el estado de conservación de las especies de *Gymnophiona* es el conocimiento incompleto de la identidad y riqueza de especies de este grupo.

El Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador mantiene una de las colecciones de especímenes y muestras de genoma más grandes del género *Caecilia*. En el presente trabajo realizamos una revisión de la sistemática del género *Caecilia* del occidente de Ecuador en base a este material. Este es el primer trabajo de sistemática de *Caecilia* en base a caracteres genéticos.

Materiales y métodos

Declaración de Ética

Los especímenes y muestras de tejido fueron obtenidos siguiendo protocolos éticos y técnicos [9]. Los especímenes fueron sacrificados con roxicaina comercial (spray anestésico), se fijaron en formalina tamponada al 10% y luego se conservaron en etanol al 75%. Los permisos de campo fueron emitidos por el Ministerio de Medio Ambiente del Ecuador (001-11 IC-FAU-DNB / MA; 002-2012-CA-FAU- MAE-DPO-PNY; 005-12-IC-FAU-DNB / MA; 005 -2009-INVESTIGACIÓN NB-DPMS / MAE; 008 ± 09 IC-FAU-DNB / MA; 010-2013-FAU-MAE-DPAO-PNY). Este estudio fue evaluado y aprobado por la Dirección General Académica (DGA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de acuerdo con las directrices para los impactos ambientales y sociales de los proyectos de investigación. Los datos genéticos de los ejemplares se obtuvieron bajo el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015-0025, emitido por el Ministerio de Ambiente del Ecuador a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Todos los individuos analizados pertenecen al género *Caecilia* del Ecuador y fueron colectados fortuitamente en salidas al campo entre 1987 y 2016, cuyo objetivo era la documentación de la diversidad y distribución de anfibios. Se incluyen secuencias de especímenes de la cuenca amazónica debido a su disponibilidad previa, sin embargo los análisis del presente estudio se centran en las especies de la vertiente pacífica.

La extracción y amplificación de ADN se realizó a partir de especímenes y muestras de genoma del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ). Los especímenes fueron preservados en etanol al 75% y sus muestras de genoma (tejido de hígado y músculo) en etanol al 95%. Los tejidos fueron mantenidos en ultracongeladoras a -80°C . Para la extracción de ADN se siguió el protocolo estandarizado del Laboratorio de Biología Molecular de Herpetología y posteriormente se realizó la cuantificación de la cantidad de ADN de las extracciones mediante Nanodrop.

Se amplificaron fragmentos de ADN de los genes mitocondriales *12S*, *tRNA-val*, *16S*, *tRNA-leu* y *ND1* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La selección de cebadores se hizo considerando la base de datos del laboratorio y el estudio realizado por San Mauro et al. [10] (Tabla 1) con controles negativos para cada ensayo. Las amplificaciones por PCR se realizaron bajo protocolos estándar con 25 μl de reacción que contenían 18.25 μl de dH_2O , 2.5 μl de Buffer 10X, 1.5 μl de MgCl_2 50 mM, 0.5 μl de dNTPs 10 mM, 0.25 μl de Qiagen Taq ADN polimerasa, 0.5 μl de cada cebador (forward y reverse) 10 μM y 1 μl de ADN extraído. Los productos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% para evaluar la presencia de

amplicones y evidenciar si existe contaminación. Los fragmentos fueron secuenciados por la empresa Macrogen, Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas (forward y reverse) fueron ensambladas mediante la aplicación Geneious R7.1 (Biomatters Ltd.). Se incluyeron en la matriz cuatro secuencias adicionales de GenBank para el género *Caecilia*, además de los siguientes grupos externos: *Chthonerpeton indistinctum*, *Typhlonectes natans*, *Osaecilia ochrocephala*, *Microcaecilia dermatophaga*, *Microcaecilia unicolor* y *Microcaecilia* sp., obteniendo un total de 51 muestras. Se cortaron los extremos de las secuencias para eliminar las bases de baja calidad y se realizó el alineamiento usando el algoritmo Geneious. Se importó la matriz a la aplicación Mesquite v3.04 (Maddison y Maddison, [14]) y las regiones alineadas ambiguas fueron ajustadas manualmente para producir una alineación parsimoniosa.

Se utilizó el software PartitionFinder v.1.1.1 [15] para estimar el modelo de sustitución de ADN de mejor ajuste para cada partición así como la estrategia óptima de partición. Las particiones se hicieron por gen y por posición de los codones en el caso del gen codificante *ND1*. La selección fue realizada utilizando el Criterio Bayesiano de Información (BIC) para discernir entre modelos y particiones alternativos. Se definieron siete particiones a priori, para los genes no codificantes (*12S*, *tRNA-val*, *16S* y *tRNA-leu*, total = 4) y tres para *ND1*.

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas mediante dos criterios de optimalidad: Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Se estimó el soporte de las ramas de la filogenia con bootstrap no paramétrico en el caso de Máxima Verosimilitud y

probabilidades posteriores en el Análisis Bayesiano [16]. Se realizaron análisis separados para cada gen (*12S*, *16S* y *ND1*) así como un análisis conjunto de todo el set de datos con el objetivo de identificar incongruencias entre los árboles resultantes.

Los análisis de máxima verosimilitud fueron realizados usando GARLI v2.0 [17]. Se realizaron un total de 20 corridas independientes: 10 empezando desde árboles stepwise y 10 con árboles generados al azar, ajustando el parámetro $gthreshfortopterm = 150000$; se escogió el árbol con la verosimilitud más alta. Para estimar los valores de soporte para los nodos se realizó bootstrap no paramétrico con 200 réplicas; cada búsqueda se realizó con árboles generados al azar. El árbol consenso fue estimado en Mesquite v3.04 [14] bajo el valor de la regla de la mayoría, establecido en el 50%. Los valores de bootstrap $\geq 70\%$ fueron considerados como soporte alto [18].

La Inferencia Bayesiana se realizó en MrBayes v.3.1.2. [19]. Se realizaron 4 corridas paralelas e independientes utilizando el algoritmo de la cadena Markov de Monte Carlo, cada una por 1×10^7 generaciones, con muestreo cada 1000 generaciones. Cada corrida se realizó con 4 cadenas con una temperatura de 0.1. El primer 10% de árboles muestreados fue descartado (burn-in) y los restantes fueron empleados para estimar el árbol Bayesiano y sus probabilidades posteriores. Los clados con probabilidades > 0.95 fueron considerados de soporte alto. Se calculó la media no corregida de las distancias genéticas (distancias *p*-no corregidas) entre especies mediante MEGA 7 [20] para el gen *16S*, para lo cual se usaron 500 réplicas bootstrap como método de estimación de la varianza.

Análisis morfológicos

Se realizó una evaluación morfológica de los caracteres diagnósticos y métricos de especímenes. El sexo y condición reproductiva fueron determinados mediante disección y tomando en cuenta el desarrollo de las gónadas (machos adultos: cuerpos grasos desarrollados adheridos a los testículos; hembras: presencia de oocitos y cuerpos grasos) [21].

Caracteres diagnósticos

Se realizó una comparación entre los rasgos morfológicos de los especímenes y los datos de especies del género *Caecilia* provistos por Günther [22], Boulenger [23], Dunn [24], Taylor [25, 26], Taylor y Peters [6], Lynch [27] y Fletcher-Lazo [7] que realizan una compilación y descripción del 80% de las especies de este género descritas hasta la actualidad.

La terminología y definición de los caracteres diagnósticos se tomaron de Taylor [25]. Lynch [27] provee figuras esquemáticas de los caracteres principales de identificación morfológica. Los caracteres analizados fueron: número de surcos primarios, surcos secundarios y surcos secundarios completos, presencia o ausencia de escudo terminal (medido dorsalmente cuando estaba presente), visibilidad externa del ojo, coloración en etanol 75%, coloración en vida cuando se contó con fotografías disponibles y número de vértebras; para cuantificar el número de vértebras se realizaron radiografías.

Caracteres morfométricos

Se realizó además el análisis de medidas morfométricas siguiendo la nomenclatura de Fletcher-Lazo [7]. Las medidas tomadas fueron: longitud total (LT), ancho del cuerpo (ACU), longitud cefálica (LC), anchura cefálica (AC), distancia inter-orbital (IO), longitud del rostro (LR), distancia orbita-narina (ON), distancia tentáculo-narina (TN),

distancia inter-narinas (IN) y distancia inter-tentáculos (IT). Las medidas fueron tomadas con calibradores digitales con precisión de 0.01 mm, con excepción de la longitud total que se midió con cinta métrica con precisión de 1.0 mm. Las medidas morfométricas fueron tomadas de los 35 especímenes empleados en el análisis filogenético.

Se realizaron análisis estadísticos en JMP 9.01 [28]. Las variables morfométricas (LT, ACU, LC, AC, IO, ON, IN, TN, IT) se sometieron a normalización logarítmica, cuando no presentaron distribución normal; posteriormente se realizaron regresiones simples para remover el efecto del tamaño, para lo cual, se utilizó LT como variable independiente.

Se efectuó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para evaluar la diferenciación entre especies; para esto se emplearon los residuales de las regresiones. El ACP se realizó solo para los especímenes adultos con el propósito de eliminar el efecto de crecimiento alométrico. Solo los componentes principales con autovalores > 1 fueron tomados en cuenta.

Protocolo para la delimitación de especies

Para la delimitación de especies se siguió el modelo de taxonomía integrativa [29 y 30]. Este modelo procura delimitar especies basándose en la congruencia entre conjuntos de caracteres independientes como los genéticos, morfológicos, ecológicos, bioacústicos, etc. Los límites de especies fueron evaluados utilizando dos conjuntos de caracteres independientes: genético y morfológico en base a la metodología propuesta por Vieites et al. [29]. Para identificar especies candidatas se empleó el umbral predeterminado de distancia genética del 3% (i.e., consideramos especies candidatas a aquellos grupos

genéticos que presentaban distancias genéticas $> 3\%$ con respecto a otros grupos). Las especies candidatas fueron asignadas a tres categorías: (1) Especies Candidatas Confirmadas, aquellas que presentaron covariación entre los datos genéticos y morfológicos, (2) Especies Candidatas no Confirmadas, cuando los datos morfológicos no fueron suficientes para su evaluación, y (3) Linajes Conespecíficos Profundos cuando la variación morfológica era incongruente con la variación genética. Además, se evaluó el estado de conservación de acuerdo con los criterios de la Lista Roja IUCN [31].

Resultados

Relaciones filogenéticas

La matriz completa para los análisis filogenéticos constó de tres genes mitocondriales, teniendo un total de 3276 bp (492 para *12S*, 69 para *tRNA-val*, 1672 para *16S*, 74 para *tRNA-leu* y 969 para *ND1*). PartitionFinder escogió tres particiones como mejor estrategia de análisis: *12S*, *tRNA-val*, *16S*, *tRNA-leu* y *ND1* 1^{ra} posición (GTR+I+G), *ND1* 2^{da} posición (HKY+I+G) y *ND1* 3^{ra} posición (HKY+G). Las topologías de los árboles fueron similares tanto para Máxima Verosimilitud como Inferencia Bayesiana con valores de soporte altos en la mayoría de las ramas. La relaciones filogenéticas con los grupos externos concuerdan con la filogenia de San Mauro et al. [32] basada en genomas mitocondriales.

Dentro del género *Caecilia* del Ecuador (especímenes QCAZ) se encontraron 17 especies candidatas (i.e., clados con distancias genéticas $> 3\%$, gen *16S*, con respecto a otros clados; Fig 1), de las cuales 13 corresponden a la vertiente pacífica (Fig 1, Tabla 2). Hay una divergencia basal entre dos clados que incluyen, cada uno, especies de la

vertiente pacífica y amazónica. El primer clado incluye un subclado de especies de las zonas bajas de la vertiente pacífica de Ecuador y Centroamérica, hermano a las especies amazónicas *C. gracilis*, *C. tentaculata* y *C. sp.* Todas estas especies a su vez son hermanas de *C. orientalis*. El subclado de la vertiente pacífica contiene especímenes de Esmeraldas exceptuando únicamente a QCAZ-A 23580 de Guayas, QCAZ-A 42637 de El Oro y QCAZ-A 7146 de Pichincha. El clado M está cercanamente relacionado a la especie *C. volcani* que es endémica de Panamá. Los clados I y J son hermanos de los clados K, L, M.

En el segundo clado hay un subclado de especies de la cuenca amazónica hermano a un subclado de ocho especies candidatas de bosques montanos y piemontanos de la vertiente pacífica de Ecuador, con excepción de los clados A y B. Los clados A, B, C, D y E son alopátricos respecto a F, G y H ya que estos últimos están restringidos a la provincia de Azuay y son los únicos que se encuentran en el suroccidente ecuatoriano, mientras que los primeros se restringen al noroccidente de Ecuador (Provincias de Esmeraldas, Manabí, Pichincha, Cotopaxi, Carchi e Imbabura).

Análisis morfológicos

Se examinaron individuos del género *Caecilia* depositados en la colección QCAZ incluyendo los 35 especímenes de la vertiente pacífica analizados en la filogenia (Tabla S1); las medidas morfométricas de los especímenes de la filogenia se detallan en la Tabla 3.

Caracteres diagnósticos

Se reporta la presencia de escudo terminal para el segundo clado (A-H en Fig 1) con excepción del subclado B. El primer clado está representado por subclados con escudo

terminal conspicuo (M en Fig 1), subclados con escudo terminal inconspicuo (J y K en Fig 1) y subclados sin escudo terminal (I y L en Fig 1).

En cuanto a la visibilidad del ojo la mayoría de los subclados presentan el ojo visible, con excepción del subclado J que presenta ojo cubierto (no visible externamente) y los subclados I y K que presentan especímenes con el ojo visible o cubierto (Tabla 4). El patrón de coloración es una característica que en conjunto con los demás caracteres cualitativos ayudan a la identificación de especies, su variación se detalla en la Tabla 4.

El número de surcos primarios, surcos secundarios, surcos secundarios completos y número de vértebras para cada espécimen de la filogenia se detallan en la Tabla S2.

Caracteres morfométricos

Los resultados obtenidos del ACP muestran componentes principales que explican el 92.93% de la variación total (Tabla 5). El CP1 explica el 90.2% de la variación y tiene cargas altas en todas las variables; el CP2 explica el 2.91% de la variación pero su autovalor no es significativo. La proyección de los individuos sobre CP1 y CP2 muestra solapamiento, por lo cual el PCA no permitió diferenciar a las especies entre sí (Fig 2).

Tratamiento taxonómico

Los análisis genéticos revelaron la presencia de 13 especies candidatas para la vertiente pacífica del Ecuador. La divergencia entre secuencias para el gen *16S* presenta un rango de 3.5 a 14.7% entre clados (A-M) y de 0 a 1.1% dentro de los clados (Tabla 2).

Los nombres disponibles para las poblaciones examinadas en nuestro estudio son: *C. nigricans* (Boulenger, 1902), *C. guntheri*, (Dunn, 1942) *C. buckleyi*, (Boulenger, 1884) *C. pachynema* (Günther, 1859), *C. leucocephala* (Taylor, 1968) y *C. tenuissima*

(Taylor, 1973). La asignación de los nombres disponibles a los clados del presente estudio se realizó mediante la revisión de descripciones publicadas (Fig 1).

Mediante la integración de dos líneas de evidencia, genética y morfológica, se identificaron nueve especies candidatas confirmadas: *C. nigricans* (clado A), *C. guntheri* (clado C), *C. buckleyi* (clado E), *C. pachynema* (clado G), *C. leucocephala* (clado K), *C. tenuissima* (clado J), *C. sp.* (clado D), *C. sp.* (clado L) y *C. sp.* (clado M). Además, se registraron tres especies candidatas no confirmadas: *C. aff. nigricans* (clado B), *C. aff. pachynema* (clados F y H) y *C. aff. leucocephala* (clado I). A continuación se detallan las asignaciones de los clados a las diferentes especies y su argumentación.

El holotipo de *C. nigricans* es un espécimen del que no se describe sexo ni condición reproductiva (BM 1946.9.5.52), colectado en Río Lita, Esmeraldas, Ecuador. La descripción original reporta 220 surcos, sin diferenciar entre primarios y secundarios. Debido a la brevedad e imprecisión de esta descripción, Taylor [25] redescribió la especie a partir del espécimen AMNH 13679 colectado en río Quesado, valle de Atrato, Colombia; este espécimen presenta 192 surcos primarios y 60 surcos secundarios de los cuales 6 o 7 son completos y no reporta la presencia de escudo terminal. Taylor [25] reporta, además, la variación para esta especie de 157–189 surcos primarios (incongruente con la descripción de 192 surcos primarios de AMNH 13679) y 32–62 surcos secundarios. La combinación de caracteres como el número de surcos primarios, surcos secundarios y surcos secundarios completos de los clados A y B corresponde al rango de variación descrito por Taylor [25], sin embargo el clado B presenta un rango menor de surcos secundarios (30–32) en comparación al clado A (50), además el espécimen QCAZ-A 37728 (clado A) presenta un escudo terminal inconspicuo, característica no reportada por Taylor [25] pero observable en el holotipo mediante una fotografía disponible en AmphibiaWebEcuador [5]; estas características junto con la

localidad tipo muy cercana a QCAZ-A 37728 (21 km de Durango vía al Río San Francisco, Esmeraldas) y el patrón de coloración descrito en la Tabla 4 nos permiten asignar el clado A a *C. nigricans* y el clado B a *C. aff. nigricans*.

El holotipo de *C. guntheri* (BM 1946.9.5.12), “Western Ecuador” presenta 119 surcos primarios, 10 surcos secundarios de los cuales ninguno es completo, escudo terminal presente y ojo visible [24]. Estos datos, además del patrón de coloración, concuerdan con los reportados para especímenes del clado C por lo cual asignamos este clado a *C. guntheri*.

El clado E es asignado a *C. buckleyi*. Esta especie fue sinonimizada bajo *C. pachynema* por Dunn [24] y revalidada por Fletcher [7]. El holotipo (BM 1946.9.5.15) es un juvenil colectado en Intag y presenta las siguientes características: 175 surcos primarios, 0 surcos secundarios, presencia de escudo terminal, ojo visible. Fletcher [7] hace una descripción del rango de variación detallado para esta especie en base a la revisión del holotipo y 41 especímenes, reportando los siguientes datos: 149–175 surcos primarios, 0–8 surcos secundarios y ningún surco secundario completo. Estos datos son congruentes con los especímenes del clado E además del patrón de coloración (Tabla 4), por lo cual lo asignamos a esta especie.

El holotipo de *C. pachynema* (BM 1946.9.6.83) es una hembra con localidad tipo “Western Ecuador”. La descripción original de Günther [22] es breve e imprecisa, por lo cual Taylor [25] redescrive la especie en base al espécimen AMNH 16986 colectado en Pallatanga, Ecuador e incluye al holotipo de *C. buckleyi*. Debido a que Fletcher [7] revalida *C. buckleyi*, redescrive el holotipo de *C. pachynema* (hembra que presenta 169 surcos primarios y 0 surcos secundarios, escudo terminal conspicuo y ojo visible) y reporta un rango 164–215 surcos primarios en base a la revisión de seis especímenes.

Las características comunes para esta especie son: ausencia de surcos secundarios, presencia de escudo terminal, ojo visible externamente y patrón de coloración distintivo de otras especies del occidente ecuatoriano (Tabla 4). Los clados F, G y H presentan todas estas características, con excepción del patrón de coloración: QCAZ-A 32405 (clado F) no presenta las bandas laterales de color crema amarillento, sin embargo esta variación se puede deber a su mal estado de preservación, QCAZ-A 62959 (clado H) sí presenta estas bandas laterales con la diferencia que en este espécimen se unen aproximadamente a 1.0 cm de la cloaca en la región ventral. Debido a que solo los especímenes del clado G cumplen con la coloración descrita para *C. pachynema*, lo asignamos a esta especie y los clados F y H los asignamos a *C. aff. pachynema*.

El holotipo de *C. tenuissima* (USNM 12353) es un espécimen sin determinación de sexo ni estado de desarrollo colectado en Guayaquil, Ecuador. Presenta 186 surcos primarios, 9 surcos secundarios y 4 surcos secundarios completos; el ojo no es visible externamente y presenta escudo terminal inconspicuo. Debido a estas características distintivas además del patrón de coloración (Tabla 4) y la localidad tipo asignamos el clado I a *C. tenuissima*.

El holotipo de *C. leucocephala* (KU 200985) es un juvenil colectado en Río Riposo, Valle del Cauca, Colombia; tiene 118 surcos primarios, 42 surcos secundarios, 8 o 9 surcos secundarios completos, escudo terminal inconspicuo y ojo vagamente visible externamente. Uno de los rasgos más visibles de esta especie es el color blanco de la cabeza con respecto al cuerpo. El clado K corresponde a estas características por lo cual es asignado a *C. leucocephala*.

El clado I presenta características muy similares a *C. leucocephala* incluyendo la coloración blanca de la cabeza; las diferencias radican en que los especímenes del clado

I tienen un rango mayor de surcos primarios (143–149) y la ausencia de escudo terminal, por lo cual asignamos este clado a *C. aff. leucocephala*.

Los clados D, L y M presentan características propias para diferenciarlos de las especies descritas hasta la actualidad (Tabla 4), por lo cual asignamos el clado L a *C. sp.* y a continuación realizamos la descripción de los clados D y M como dos especies nuevas de la vertiente pacífica del Ecuador.

***Caecilia carchense* sp. nov.**

Holotipo: QCAZ-A 55102 (Serie de campo SC-PUCE 43244), macho adulto de Ecuador, Provincia Carchi, Cantón Tulcán, Chilmá Bajo, colectado por David Salazar el 21 de febrero de 2013.

Paratipos (3): Ecuador, Provincia Carchi, QCAZ-A 39978 macho adulto, Chilmá Bajo, Finca de Aníbal Pozo, colectado por Aníbal Pozo el 23 de febrero de 2009; QCAZ-A 55100 macho adulto, km 19.5 vía El Chical-Gualchán, colectado por David Salazar el 21 de febrero de 2013; QCAZ-A 55101 macho adulto, Chilmá Bajo, colectado por David Salazar el 21 de febrero de 2013.

Nombre común en español: Cecilia de Carchi.

Diagnosis: Especie robusta caracterizada por la combinación de los siguientes caracteres: (1) presencia de escudo terminal, (2) ojo en órbita no cubierta por hueso, muy visible, (3) 138–160 surcos primarios, (4) 9–15 surcos secundarios, (5) 2–3 surcos secundarios completos, (6) 146–160 vértebras, (7) hocico corto, redondeado en vista dorsal y lateral, (8) color gris oscuro dorsal, los flancos y el vientre gris claro.

Comparación con otras especies: *C. carchense* es la especie hermana de *C. buckleyi*; la coloración de estas dos especies es similar, gris oscuro dorsal y gris claro

ventrolateralmente con los surcos de color gris oscuro a lo largo de todo el cuerpo; los surcos primarios también se solapan en parte de su rango (*C. buckleyi* = 149–177) sin embargo *C. carchense* presenta más surcos secundarios (9–15 vs. 0–6 en *C. buckleyi*) de los cuáles 2 a 3 son completos (surcos secundarios completos ausentes en *C. buckleyi*).

C. carchense se diferencia de *C. nigricans* y *C. aff. nigricans* principalmente en que estas presentan un rango mayor de surcos primarios (185 en *C. nigricans* y 167–185 en *C. aff. nigricans* vs. 138–160 en *C. carchense*) y de surcos secundarios (50 en *C. nigricans* y 30–32 en *C. aff. nigricans* vs. 9–15 en *C. carchense*), además de la presencia de escudo terminal conspicuo en *C. carchense*.

C. carchense se solapa con *C. subnigricans* [24] en el número de surcos primarios (138–160 en *C. carchense* vs. 154–161 en *C. subnigricans*) y se diferencia ligeramente en el número surcos secundarios (9–15 en *C. carchense* vs. 17–18 en *C. subnigricans*) y surcos secundarios completos (2–3 en *C. carchense* vs. 4–8 en *C. subnigricans*); sin embargo, una de las mayores diferencias es la presencia de escudo terminal conspicuo en *C. carchense* (*C. subnigricans* presenta un escudo terminal inconspicuo).

Descripción del holotipo: El espécimen está un poco comprimido dorsoventralmente y la superficie ventral ligeramente aplanada, por defecto del estado de preservación. El hocico es redondeado en vista dorsal y lateral y se proyecta 2.79 mm por delante del extremo anterior de la mandíbula inferior; la cabeza es semiovalada con el extremo anterior angosto; los ojos están ubicados dorsolateralmente, su órbita no está cubierta por hueso por lo que son visibles externamente como dos abultamientos negruzcos; las narinas están ubicadas cerca del extremo anterior del rostro y son visibles dorsalmente; los tentáculos se encuentran posteroventrales a las narinas y no son visibles

dorsalmente. La región nugal es más ancha que la cabeza y tiene dos collares nucales bien definidos. El primer collar nugal mide 3.0 mm de longitud, el surco anterior no está unido ventralmente; el segundo collar nugal mide 5.0 mm de longitud y el surco que lo separa del primer collar nugal está unido ventralmente, el surco posterior es incompleto en la región ventral y se separa claramente del primer surco primario. Ambos collares presentan un surco transversal dorsal (Fig 3).

Tiene 160 surcos primarios, incompletos dorsal y ventralmente en las primeras tres cuartas partes del cuerpo, y 13 surcos secundarios de los cuales 3 son completos. El escudo terminal mide 3.8 mm de longitud e interrumpe 3 surcos primarios dorsales; se observan dos papilas cloacales. 168 vértebras (Fig 4). Su longitud total es 683 mm y la relación LT/ACU es de 53.05.

Coloración en vida (en base a fotografía a color; Fig 5): gris negruzco dorsal con la cabeza un poco más clara de un tono gris azulado, ventrolateralmente es gris claro interrumpido por los surcos de color gris oscuro, el área circundante a la boca, narinas y tentáculos es crema amarillento.

Coloración en etanol 75%: gris oscuro dorsal con la región ventrolateral color crema, principalmente el primer tercio del cuerpo; manchas cremas irregulares en la región ventral posterior, el área circundante a la boca, narinas y tentáculos es de color crema amarillento (Fig 3).

Variación: La variación en el número de surcos se muestra en la Tabla 4 y el S2; la variación morfométrica se muestra en la Tabla 3. El escudo terminal está presente en todos los individuos. QCAZ-A 55101 tiene el primer collar nugal similar al holotipo, sin embargo, el surco posterior del segundo collar nugal se une parcialmente al primer surco primario en la región ventral. QCAZ-A 55100 presenta los collares en vista posterior tal

como los descritos anteriormente, sin embargo no se aprecia la parte ventral defectos de preservación.

Coloración en vida: Los especímenes QCAZ-A 55101 y QCAZ-A 39978 presentan el color gris ventrolateral más claro que el holotipo, los surcos son color gris oscuro; además tienen la cabeza del mismo color que el resto del cuerpo (gris negruzco). No hay información para QCAZ-A 39978 (Fig 5).

Coloración en etanol 75%: Todos los especímenes son de color gris oscuro en la parte dorsal, la coloración ventral varía como la descrita en vida pero con tonalidades más opacas debido a la preservación (Fig 6).

Distribución y estado de conservación: *Caecilia carchense* es una especie encontrada únicamente en la provincia de Carchi en dos localidades, Chilmá Bajo y en la vía El Chical-Gualchán. Su rango de elevación es 2064–2071 msnm. La distancia aérea entre las dos localidades conocidas es 20.11 km. La asignamos a la categoría Datos Deficientes por el escaso número de especímenes disponibles.

Información ecológica: QCAZ-A 55100 fue encontrado muerto en la carretera, QCAZ-A 55101 fue colectado al cavar en una zona de potrero destinada para agricultura cerca de un riachuelo y QCAZ-A 55102 fue encontrado cavando en una acumulación de piedras. QCAZ-A 39978 fue colectado por Aníbal Pozo y trabajadores entre 10:00-15:00 junto a una casa durante una excavación en zona de ruinas arqueológicas en suelo con tierra y abundantes piedras de río. No existe más información disponible para estos especímenes.

Etimología: El nombre de la especie es un sustantivo que hace referencia a la provincia de Carchi, área donde fue descubierta. Carchi es una palabra que proviene del idioma

chaima caribe y quiere decir “al otro lado” o del vocablo chibcha según el cual equivaldría a “límite de agua”.

***Caecilia truncatus* sp. nov.**

Holotipo: QCAZ-A 27774 (Sin número de campo), macho adulto de Ecuador, Provincia Esmeraldas, Cantón San Lorenzo, Alto Tambo, colectado por Ítalo Tapia el 02 de noviembre de 2005.

Paratipos (1): Ecuador, Provincia Esmeraldas, QCAZ-A 40305 macho juvenil, Alto Tambo, colectado por Diego Almeida, Andrea Manzano, Santiago Ron e Ítalo Tapia el 14 de marzo de 2009.

Nombre común en español: Cecilia de hocico truncado

Diagnosis: Especie robusta caracterizada por la combinación de los siguientes caracteres: (1) presencia de escudo terminal, (2) ojo en órbita no cubierta por hueso, muy visible, (3) 123 surcos primarios, (4) 8 surcos secundarios, (5) ningún surco secundario completo, (6) 128 vértebras, (7) hocico corto, con la punta truncada en vista dorsal, (8) color gris oscuro dorsal y ventral, los flancos de color gris más claro al igual que la cabeza y cuello, no siempre notorio.

Comparación con otras especies: *C. truncatus* es especie hermana de *C. volcani*, una especie endémica de Panamá. Se solapan en número de surcos primarios (112–124 en *C. volcani*) sin embargo *C. truncatus* tiene menor número de surcos secundarios (*C. volcani* 14–32) y no presenta surcos secundarios completos a diferencia de *C. volcani* que presenta hasta 3 surcos secundarios completos. La coloración es similar en ambas especies, *C. volcani* es gris uniforme y vagamente gris más claro en cabeza y cuello, la superficie ventral del cuerpo es grisácea con la región ventral media más oscura [33]. La

forma de la cabeza también es similar, estas dos especies presentan el extremo anterior del hocico truncado. No se reporta presencia de escudo terminal para *C. volcani*.

Caecilia truncatus es morfológicamente similar a *C. guntheri*. Los surcos primarios se solapan en su rango (108–133 en *C. guntheri*), al igual que el número de surcos secundarios (7–22 en *C. guntheri*) y surcos secundarios completos (0–11 en *C. guntheri*). Ambas son especies robustas, sin embargo, *C. truncatus* es más pequeña (LT de 441–1010 mm en *C. guntheri* vs. 118–390.3 mm en *C. truncatus*), *C. guntheri* tiene el cuerpo más robusto (LT/ACU 33.3–62.6, vs. 24.58–30.47 en *C. truncatus*). La forma del hocico es diferente en estas especies: *C. guntheri* tiene el hocico angosto, con forma ligeramente acuminada en vista dorsal mientras que *C. truncatus* tiene la punta del hocico truncada en vista dorsal. Su coloración se diferencia en que *C. truncatus* es gris uniforme y vagamente gris más claro en cabeza y cuello, presenta dos bandas laterales de un color gris más claro que el resto del cuerpo, interrumpidas por los surcos de color oscuro mientras que en *C. guntheri* el dorso es gris a café cobrizo con la región ventrolateral café-crema y la cabeza de color plomo azulado. Al parecer ambas especies son alopátricas, *C. truncatus* se encuentra en Esmeraldas y *C. guntheri* en Pichincha y Cotopaxi.

Descripción del holotipo: El espécimen está un poco comprimido dorsoventralmente y la superficie ventral ligeramente aplanada por defecto de preservación. El hocico es redondeado en vista dorsal y lateral y se proyecta 2.45 mm por delante del extremo anterior de la mandíbula inferior; la punta del hocico es truncada en vista dorsal; los ojos ubicados dorsolateralmente están en una órbita no cubierta por hueso y son visibles externamente; las narinas están cerca del extremo anterior del rostro y son visibles dorsalmente, al contrario de los tentáculos que están posteroventrales con respecto a las

narinas y no son visibles dorsalmente. El área circundante al hocico, tentáculos y narinas son crema amarillentos (Fig. 7).

La región nugal es aproximadamente del mismo ancho que la cabeza y se observan dos collares nucales bien definidos. El primer collar nugal mide 3 mm de longitud, el surco anterior está unido ventralmente al igual que el surco posterior; el segundo collar nugal mide 5.34 mm de longitud y está unido parcialmente al primer anillo primario ya que el surco posterior es incompleto medioventralmente. Ambos collares presentan un surco transversal corto en la parte dorsal. Tiene 123 surcos primarios incompletos dorsal y ventralmente en las primeras tres cuartas partes del cuerpo y 8 surcos secundarios, de los cuales ninguno es completo. El escudo terminal mide 2.06 mm de longitud e interrumpe 4 surcos primarios dorsales; no presenta papilas cloacales. 128 vértebras. Tiene una longitud total de 390.3 mm y la relación LT/ACU es de 30.47. La coloración en vida es desconocida.

Coloración en etanol 75% (Fig. 7): es gris uniforme y vagamente gris más claro en cabeza y cuello, presenta dos bandas laterales de un color gris más claro que el resto del cuerpo, interrumpidas por los surcos de color gris oscuro.

Variación: Se analizó un espécimen adicional, macho juvenil (QCAZ-A 40305). Presenta igual número de surcos que el holotipo; 128 vértebras (Fig 8). El escudo terminal está presente e interrumpe 3 surcos primarios. La relación LT/ACU es 24.58. La morfología y morfometría de la cabeza son similares en los individuos analizados. Los ojos son visibles externamente en una órbita no cubierta por hueso. En vida no se aprecian con claridad las bandas laterales tenues a lo largo del cuerpo pero si se evidencia claramente la coloración crema en las áreas circundantes al hocico, tentáculos y narinas además dedos machas claras a los lados de la cabeza (Fig 9).

Coloración en vida: No se dispone de información.

Coloración en etanol 75%: En el espécimen QCAZ-A 40305 las bandas laterales son apenas visibles. (Fig 7).

Distribución y estado de conservación: Solo se conoce de su localidad tipo en la provincia de Esmeraldas, Alto Tambo, su rango de elevación es 500–701 m. La distancia aérea entre los dos lugares de colecta es de 5.56 km. La asignamos a la categoría Datos Deficientes debido a la baja cantidad de especímenes conocidos.

Información ecológica: QCAZ-A 40305 fue encontrado en un arroyo de unos 5 m de radio junto a la carretera, sobre tierra. QCAZ-A 27774 no tiene información ecológica. No existe más información disponible para estos especímenes.

Etimología: El nombre de la especie es el participio pasivo perfecto del latín truncō que hace referencia a la forma truncada del extremo del hocico.

Discusión

Tradicionalmente la identificación y descripción de especies de cecílicos se ha realizado únicamente mediante caracteres morfológicos. La inclusión de análisis genéticos para delimitar especies e inferir las relaciones filogenéticas de Gymnophiona ha sido muy limitada. Nuestro estudio es el primero del orden Gymnophiona en incluir secuencias de un elevado número de individuos provenientes de una misma región geográfica. Por ello arroja resultados novedosos sobre la distribución geográfica de sus especies y el contenido de diversidad críptica del grupo.

En el presente estudio se emplearon marcadores moleculares para la identificación de linajes a nivel de especies entre las poblaciones de *Caecilia* del Ecuador. Se obtuvieron

13 especies candidatas entre las que se logró la identificación de nueve especies candidatas confirmadas con base en la integración de evidencia. De las nueve especies, cinco están descritas (*C. nigricans*, *C. guntheri*, *C. pachynema*, *C. leucocephala* y *C. tenuissima*), una requiere la resurrección de un binomial (*C. buckleyi*) y tres son nuevas (*C. carchense*, *C. truncatus*, *C. sp. L*).

La filogenia obtenida es consistente con los estudios realizados por San Mauro et al. [10] basado en genomas mitocondriales completos de especies de seis familias de cecílicos así como la filogenia más reciente presentada por San Mauro et al. [32] cuyo análisis comprende 45 genomas mitocondriales, que representan a todas las familias y 27 géneros. Esta última investigación es el estudio más completo sobre las relaciones filogenéticas entre la mayoría de géneros pertenecientes a Gymnophiona. Sin embargo, su muestreo de especies de *Caecilia*, el género más diverso de Gymnophiona, es muy limitado pues solo incluye tres de 33 especies.

La identificación se ha basado tradicionalmente en caracteres morfológicos como número de surcos primarios, surcos secundarios, surcos secundarios completos, coloración, dentición y presencia de escamas, además de la presencia de escudo terminal. Sin embargo, en los primeros estudios, como el realizado por Dunn [24] no se reporta la presencia de escudo terminal como un carácter de utilidad taxonómica, no obstante Taylor [25] sí le da relevancia, lo cual se ratifica en este trabajo ya que es posible diferenciar taxones por la presencia de esta característica en particular. La combinación de número de surcos primarios, surcos secundarios y surcos secundarios completos se sigue manteniendo como un dato morfológico útil para la identificación de especies.

Se excluyó el análisis de escamas subdérmicas y dentición, caracteres que varían más intra-específicamente que inter-específicamente, por lo cual no son útiles para la identificación de especies [7, 34].

La identificación morfológica de especímenes mostró ciertas incongruencias con las descripciones de estudios previos, principalmente por el número pequeño de individuos que constituyen la serie tipo en base a la cual se realizaron dichas descripciones.

Uno de los hallazgos más llamativos de este estudio es el patrón de distribución de las especies candidatas. Todas las especies tienen rangos de distribución pequeños. Esto contrasta con la información conocida de la distribución de muchas especies del género *Caecilia* y de *Gymnophiona* en general. Por ejemplo, entre las especies del occidente de Ecuador la IUCN [31] reporta los siguientes rangos geográficos: *C. nigricans* se reporta para Ecuador, Colombia y Panamá, *C. guntheri* en Ecuador y Colombia, *C. pachynema* se encuentra desde el norte al sur occidente de Ecuador y una población aislada en Colombia (sin embargo dentro de *C. pachynema* se incluyen especímenes de *C. buckleyi* y en el caso de los especímenes colombianos son una asignación temporal de Lynch [27] para una especie endémica de Colombia, diferente morfológicamente de las poblaciones ecuatorianas), *C. leucocephala* se encuentra en Ecuador, Colombia y Panamá y *C. tenuissima* en Ecuador y Colombia (el registro para Colombia corresponde a un solo espécimen).

Aunque hay pocos especímenes en la región central y sur del Ecuador, nuestro muestreo genético es el más exhaustivo geográficamente para todo el orden *Gymnophiona*. El patrón más llamativo es que en ningún caso encontramos poblaciones de la misma especie a distancias mayores de 172 km (Fig 10). Esto sugiere que en *Caecilia* los

rangos de distribución de cada especie son muy restringidos y que especies cuya distribución es grande podrían representar complejos de especies crípticas.

Implicaciones para la conservación e historia natural

La ampliación del conocimiento de la riqueza real de especies es imperativa para considerar medidas de manejo ambiental. El escaso conocimiento de este grupo de anfibios es una de las mayores limitaciones al momento de establecer el estado de conservación de las especies que lo conforman; la falta de detalles de registro en los estudios de campo, como: localidades, altitud, fechas y métodos de muestreo son factores que dificultan esta tarea. En la actualidad, de acuerdo con la lista roja de la IUCN [31], 23 de 33 especies de *Caecilia* están en la categoría Datos Deficientes. Esto demuestra la urgente necesidad de ampliar las revisiones taxonómicas como las presentadas en este trabajo.

Además, son necesarios estudios sobre su ecología; realizar análisis de contenido estomacal, por ejemplo, sería relevante para establecer cuál es el impacto que causa la destrucción y fragmentación del hábitat en el modo de vida de las especies. Es necesario concentrar esfuerzos en la colecta de estos individuos, a pesar de la dificultad por sus hábitos fosoriales, para extender la comprensión, no solo de la taxonomía sino de la historia natural de las cecilias ecuatorianas.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado con fondos de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador SENESCYT, la iniciativa Arca de Noé y la Dirección General Académica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los permisos de colecta fueron emitidos por el Ministerio de Ambiente del

Ecuador. Agradecemos a Andrea Manzano, Sebastián Espinoza y Ana Belén Carillo por el apoyo en el trabajo de laboratorio, a Diego Paucar, Fernando Ayala y Yerka Sagredo por facilitar el acceso a la colección de especímenes y muestras de tejido, a Francesca Angiolani por la determinación del sexo y estado de desarrollo de los especímenes, a Valeria Chasiluisa por la toma de fotografías de los especímenes empleados en el estudio y edición de las mismas. Un agradecimiento especial a Marcel Caminer por brindar invaluable consejos y asesoría durante la investigación.

Referencias

1. Gower DJ, Wilkinson M. Conservation biology of caecilian amphibians. *Conserv Biol* [Internet]. 2005;19(1):45–55. Disponible en: http://www.bmnh.org/PDFs/DG_05_CB.PDF
2. AmphibiaWeb. <http://amphibiaweb.org>. University of California, Berkeley, CA, USA. 2017.
3. Frost, DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (01 de enero de 2017). Base de datos electrónica disponible en <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2017.
4. Maciel AO, Hoogmoed MS. Taxonomy and distribution of caecilian amphibians (Gymnophiona) of Brazilian Amazonia, with a key to their identification. *Zootaxa*. 2011;2984:1–53.
5. Ron SR, Guayasamin JM, Yáñez-Muñoz MH, Merino-Viteri A, Ortiz DA, Nicolalde DA. AmphibiaWebEcuador. Versión 2017.0. <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>. 2017.
6. Taylor EH, Peters JA. The Caecilians of Ecuador. *Univ Kansas Sci Bull* [Internet]. 1974;50:333-346. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/part/25762>
7. Fletcher-Lazo G. Taxonomía, distribución e historia natural de los ápodos (Amphibia: Gymnophiona) del occidente ecuatoriano (Tesis). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2002.

8. Suárez-Díaz E, Anaya-Muñoz VH. History, objectivity, and the construction of molecular phylogenies. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2008;39(4):451-468.
9. McDiarmid R. Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians: Preparing amphibians as scientific specimens. In: Heyer R, Donnelly M, McDiarmid R, Hayek L, Foster M, editors. Washington-London: Smithsonian Books; 1994.
10. San Mauro D, Gower DJ, Oommen OV, Wilkinson M, Zardoya R. Phylogeny of caecilian amphibians (Gymnophiona) based on complete mitochondrial genomes and nuclear RAG1. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;33(2):413–427.
11. Pauly GB, Hillis DM, Cannatella DC, Yoder A. The history of a nearctic colonization: molecular phylogenetics and biogeography of the nearctic toads (Bufo). *Evolution (NY)* [Internet]. 2004 Nov 1;58(11):2517–2535. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1554/04-208>
12. Graybeal A. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zool J Linn Soc* [Internet]. 1997;119(3):297–338. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-3642.1997.tb00139.x>
13. Heinicke MP, Duellman WE, Hedges SB. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(24):10092–10097.
14. Maddison WP, Maddison DR. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. <http://mesquiteproject.org/>. 2015.

15. Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.* 2012;29:1695-1701. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss020>
16. Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012;13(5):303–314. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3186>
17. Zwickl DJ. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin, 125 pp. 2006.
18. Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol.* 1993;42:182–192.
19. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: Bayesian phylogenetic efficient inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 2012;61:539-542
20. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33:1870-1874.
21. Gomes AD, Moreira RG, Navas CA, Antoniazzi MM, Jared C. Review of the Reproductive Biology of Caecilians (Amphibia, Gymnophiona). *South Am J Herpetol* [Internet]. 2012 Dec 1;7(3):191–202. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2994/057.007.0301>
22. Günther CLG. Second list of cold-blooded vertebrata collected by Mr. Fraser in the Andes of western Ecuador. *Proc Zool Soc London* [Internet]. 1859;402–420. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/part/40989>

- 23.** Boulenger GA. Descriptions of two new South-American Apodal Batrachians. *Ann Mag Nat Hist* [Internet]. 1902;10:152–3. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/part/172874>
- 24.** Dunn ER. The American Caecilians. *Bull Museum Comp Zool Harvard* [Internet]. 1942;91(6):439–540. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/188022b0>
- 25.** Taylor EH. *The caecilians of the World*. Kansas. Univ Kansas Press; 1968.
- 26.** Taylor EH. A caecilian miscellany. *Univ Kansas Sci Bull* [Internet]. 1973;50:187–231. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/part/25759>
- 27.** Lynch JD. Una aproximación a las culebras ciegas de Colombia (Amphibia: Gymnophiona). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 1999;23:317-337.
- 28.** SAS Institute. *User guide*. SAS Institute. Cary. Version 9.01. <http://www.jmp.com/>. 2010.
- 29.** Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2009;106:8267-8272.
- 30.** Padial JM, Miralles A, de la Riva I, Vences M. The integrative future of taxonomy. *Front Zool* [Internet]. 2010;7(1):7-16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- 31.** IUCN. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Versión 2017-1. <http://www.iucnredlist.org>. 2017.

32. San Mauro D, Gower DJ, Müller H, Loader SP, Zardoya R, Nussbaum RA, et al. Life-history evolution and mitogenomic phylogeny of caecilian amphibians. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2014;73(1):177–189. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.009>
33. Taylor EH. A new Panamanian caecilian. *Univ Kansas Sci Bull* [Internet]. 1969;48:315–323. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/page/3279267#page/327/mode/1up>
34. Wake MH, Nygren KM, Inger RF. Variation in scales in *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona): are scales of systematic utility? *Fieldiana. Zoology* (USA). Field Museum of Natural History; 1987.

Figuras

Fig 1. Filogenia del género *Caecilia* del Ecuador. Árbol de Máxima verosimilitud obtenido de análisis de secuencias de ADN de 51 especímenes. Se secuenciaron 3 genes mitocondriales (*12S*, *16S*, y *ND1*). Los números sobre las ramas corresponden a los soportes bootstrap; los valores debajo de las ramas corresponden al soporte de probabilidades posteriores. Las letras A-M simbolizan los clados de la vertiente pacífica del Ecuador y las barras color gris corresponden a especies de la vertiente amazónica y secuencias de GenBank que no son analizadas en este trabajo.

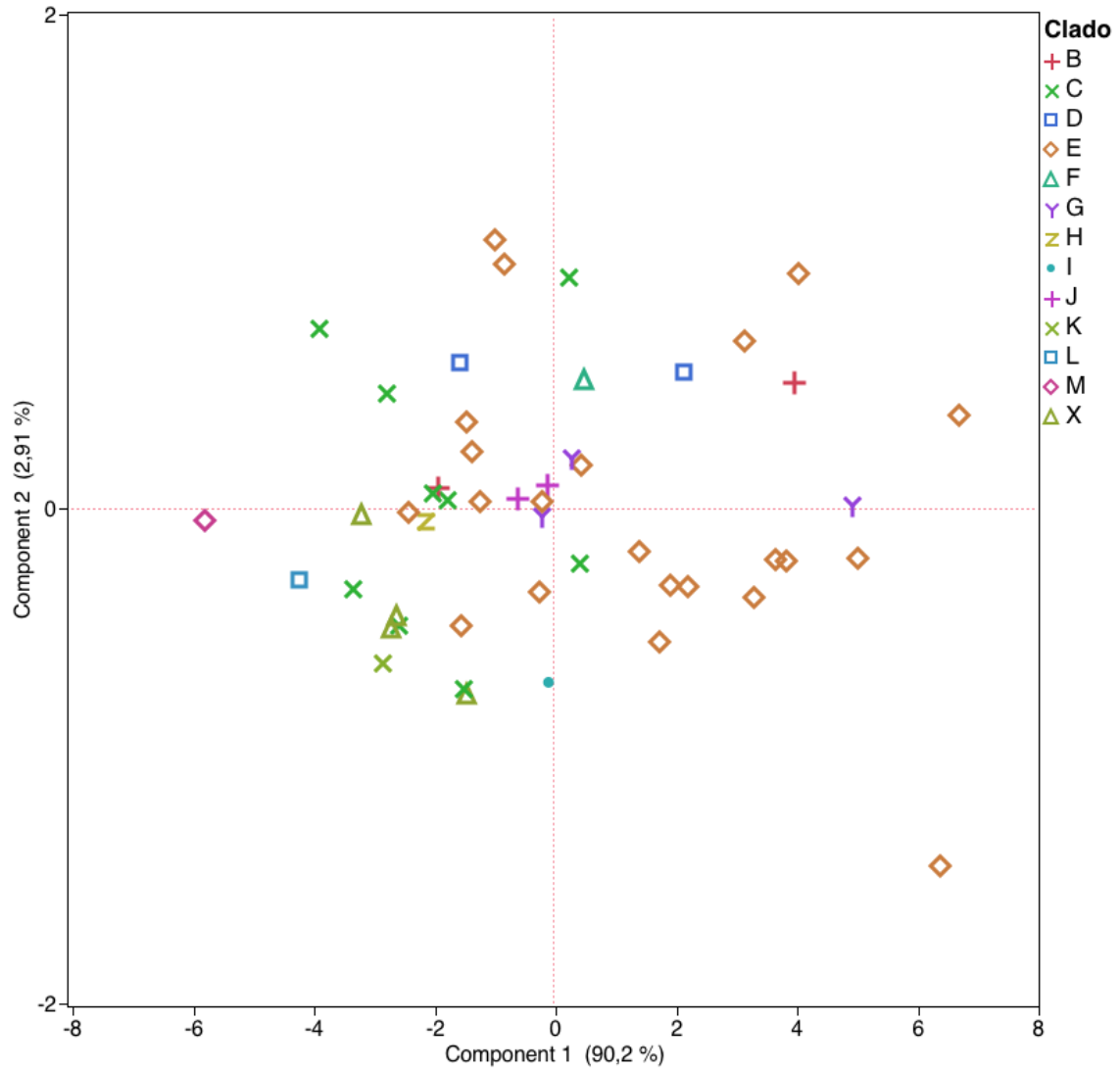


Fig 2. Ejes I y II del Análisis de Componentes Principales basado en variables morfométricas. Constan especímenes adultos examinados en la filogenia además de especímenes adicionales para *C. buckleyi* (clado E), *C. guntheri* (clado C), *C.aff. leucocephala* (X).

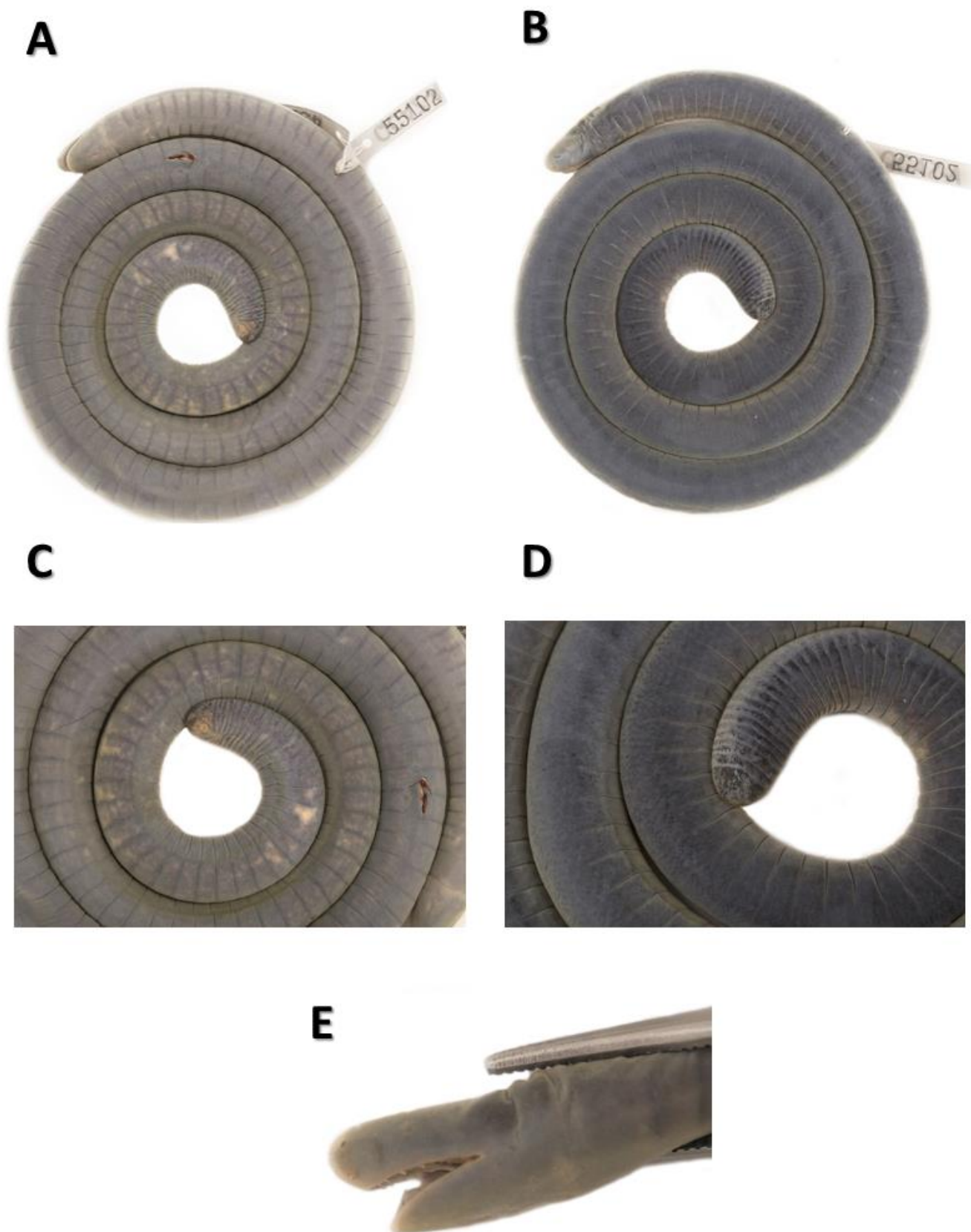


Fig 3. Holotipo *Caecilia carchense* sp. nov. QCAZ-A 55102. **A:** cuerpo entero en vista ventral. **B:** cuerpo entero en vista dorsal. **C:** terminus en vista ventral. **D:** terminus en vista dorsal, se puede apreciar claramente la presencia de escudo terminal por la ausencia de surcos en la sección final del terminus. **E.** Cabeza en posición lateral

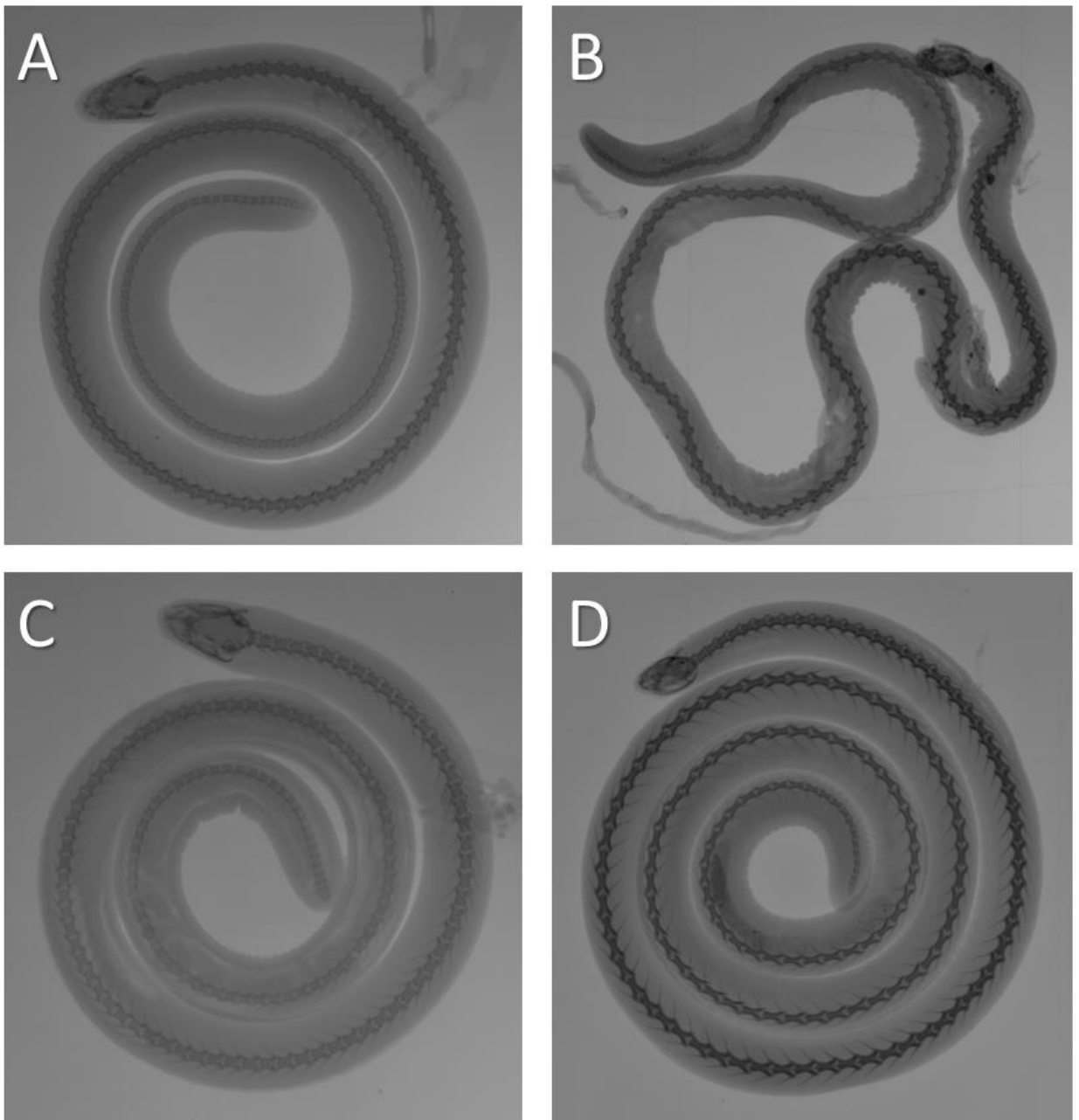


Fig 4. Radiografías de los especímenes de la serie tipo de *Caecilia carchense* sp. nov. **A:** QCAZ-A 39978. **B:** QCAZ-A 55100. **C:** QCAZ-A 55101. **D:** QCAZ-A 55102.

A**B****C**

Fig 5. Variación de coloración en vida de *Caecilia carchense* sp. nov. **A:** QCAZ-A 39978. **B:** QCAZ-A 55101. **C:** QCAZ-A 55102.

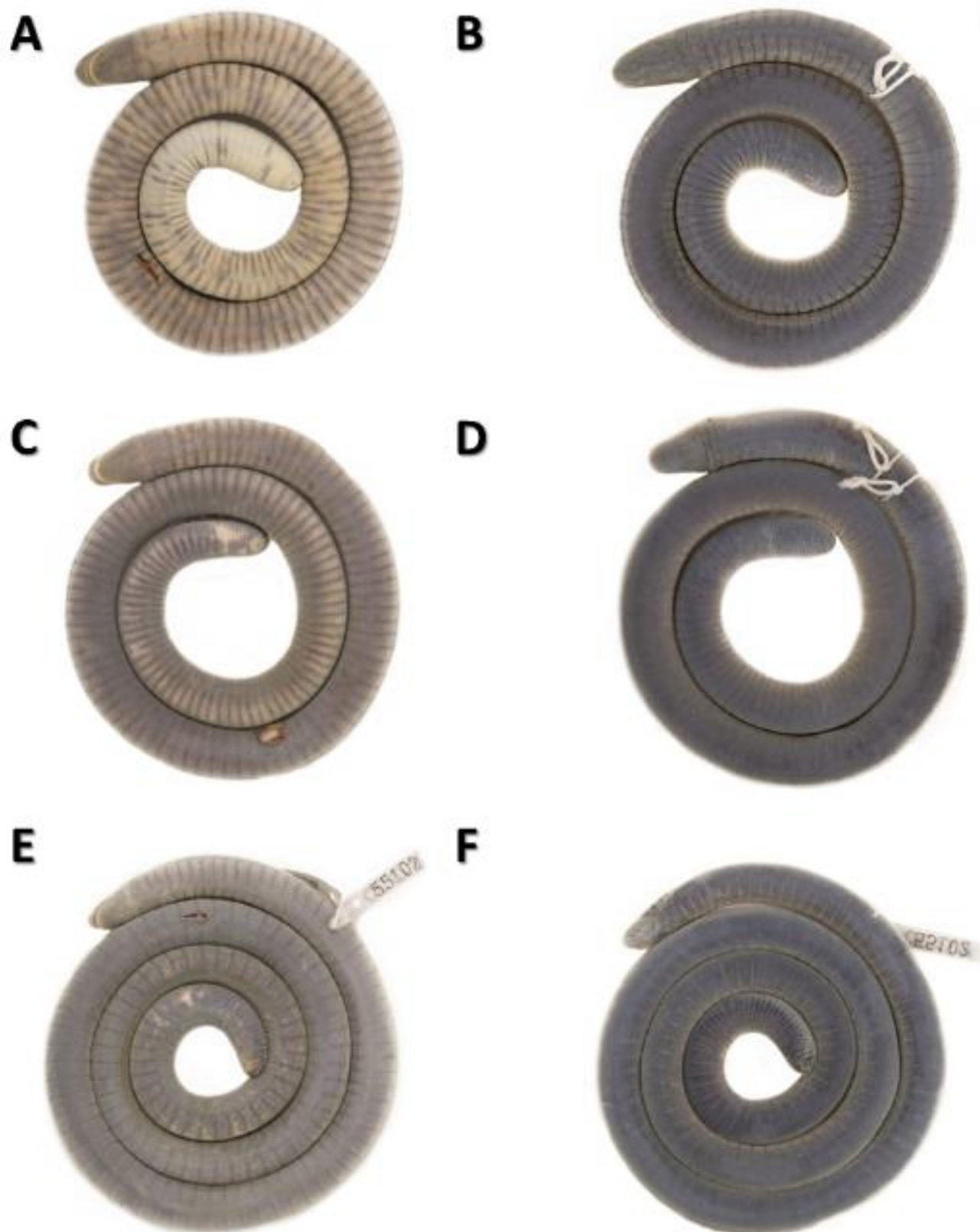


Fig 6. Variación de coloración en etanol de *Caecilia carchense* sp. nov. A y B: QCAZ-A 55101 (ventral-dorsal). C y D: QCAZ-A 39978 (ventral-dorsal). E y F: QCAZ-A 55102 (ventral-dorsal).

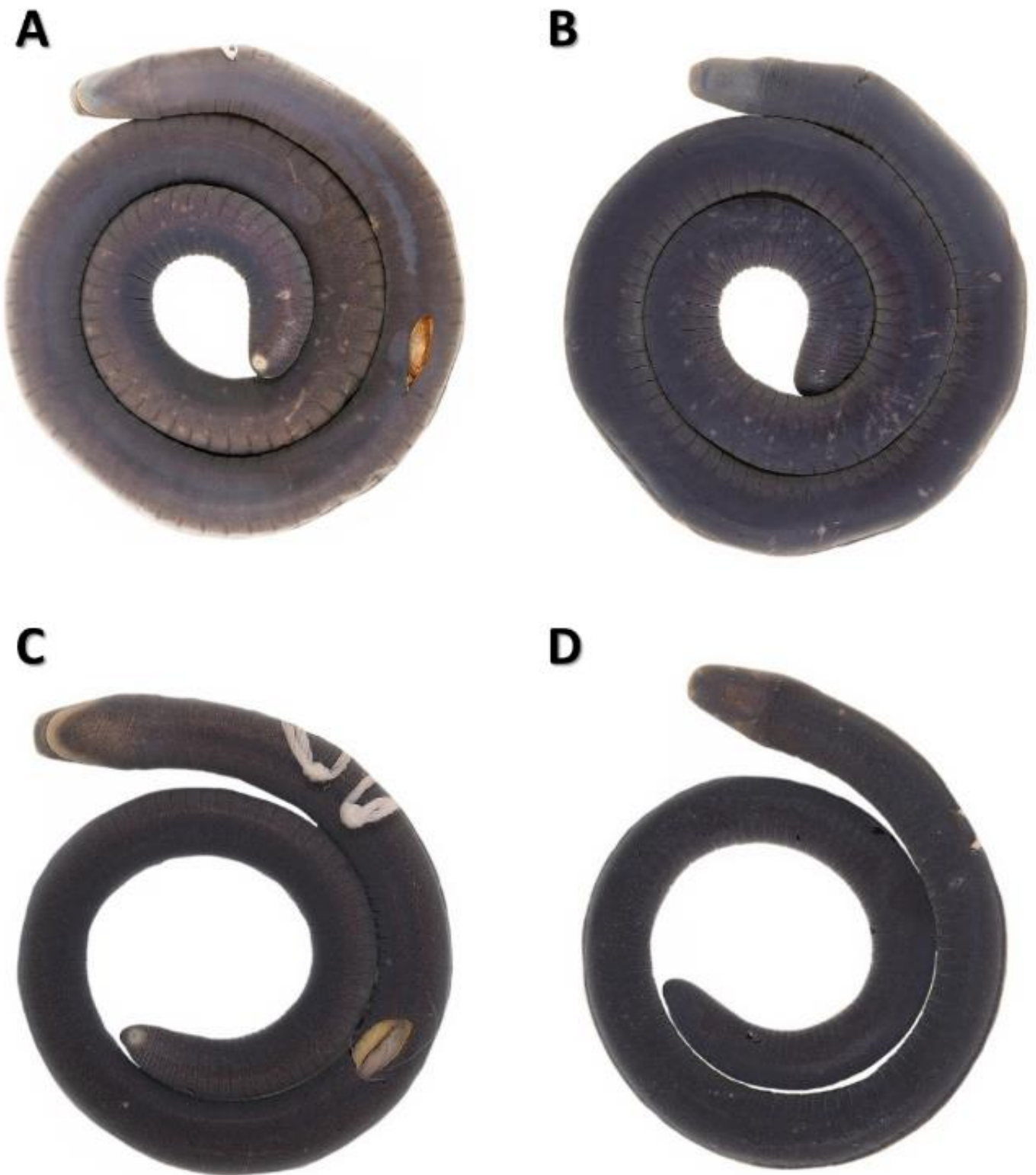


Fig 7. Variación de *Caecilia truncatus* sp. nov. Coloración en etanol **A y B:** Holotipo QCAZ-A 27774 (ventral-dorsal). **C y D:** QCAZ-A 40305 (ventral-dorsal).

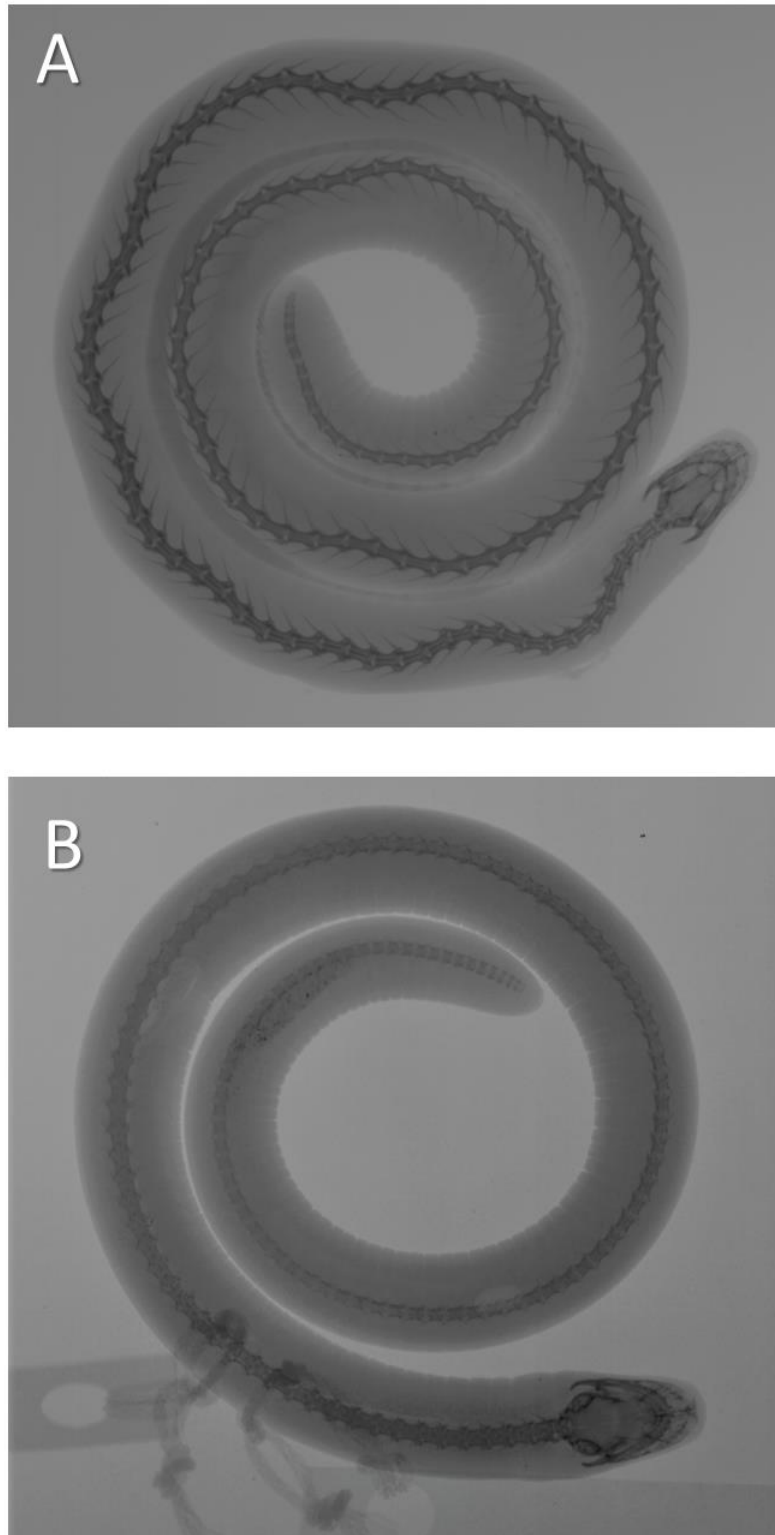


Fig 8. Radiografías de *Caecilia truncatus* sp. nov. A: QCAZ-A 27774. B: QCAZ-A 40305.



Fig 9. Coloración en vida de *Caecilia truncatus* sp. nov. QCAZ-A 40305 en vida.

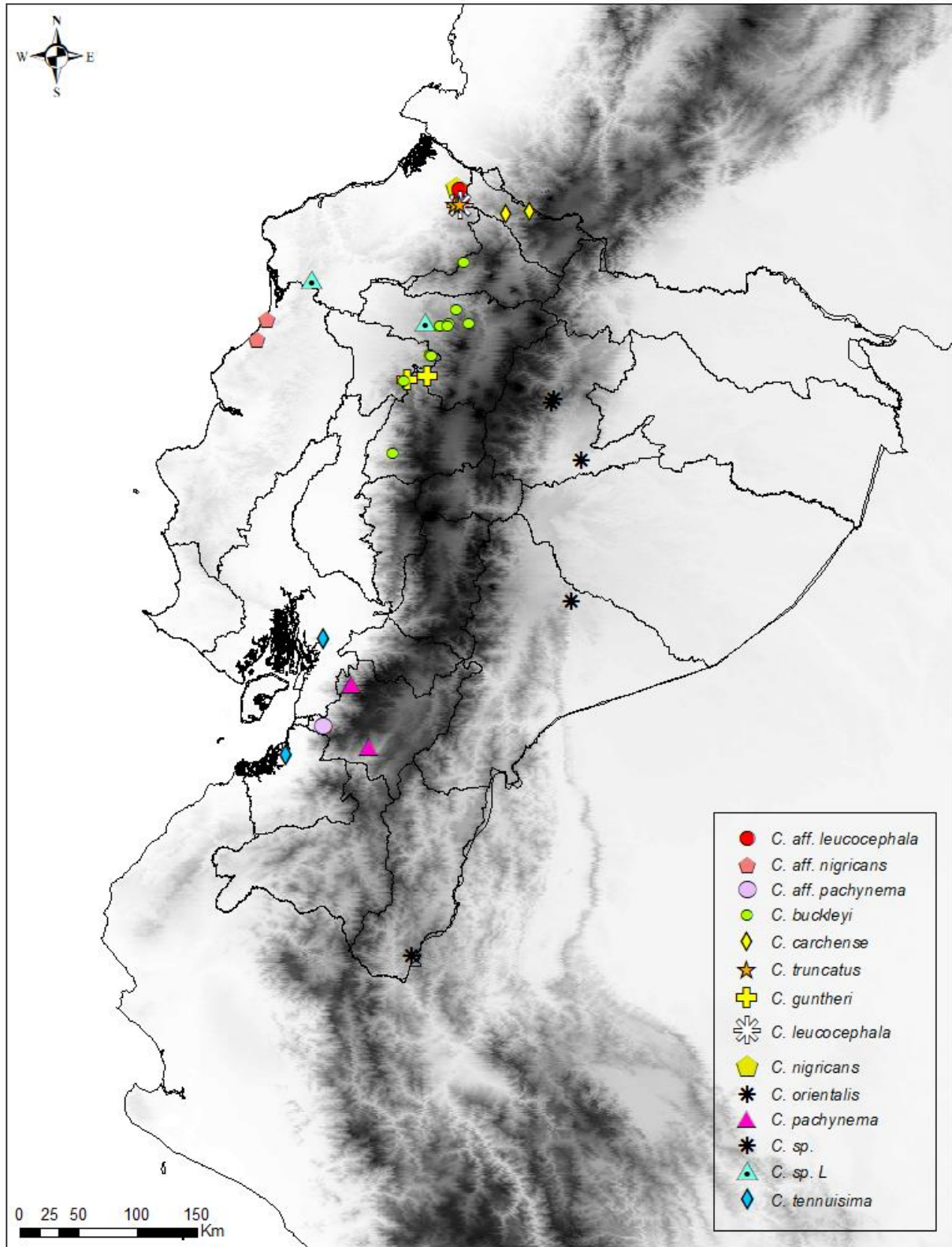


Fig 10. Mapa de Distribución del género *Caecilia* del Ecuador. Se ubican en el mapa los especímenes empleados en la filogenia. Los especímenes representados por un asterisco negro corresponden a especies de la vertiente amazónica y que no son objeto de análisis de este estudio.

Tablas

Tabla 1. Lista de cebadores empleados en el presente estudio para la amplificación y secuenciación de tres genes mitocondriales (*12S*, *16S* y *ND1*).

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Dirección	Fuente
<i>12S</i>	12L1	AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT	F	Pauly et al. [10]
	16Sh	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	R	Pauly et al. [10]
	12Sm	GGCAAGTCGTAACATGGTAAG	F	Pauly et al. [10]
	16Sa	ATGTTTTTGGTAAACAGGCG	R	Pauly et al. [10]
<i>16S</i>	Amp-12S	AAGAAATGGGCTACATTTTCT	F	San Mauro et al. [9]
	Amp-16S	AAGTGATTAYGCTACCTTTGCAC	R	San Mauro et al. [9]
	16Sc	TATGGCCTAAAAGCTGCCAC	F	Pauly, et al. [10]
	16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	R	Graybeal [11]
	16L19	AATACCTAACGAACCTTAGCGATAGCTGGTT	F	Heinicke et al. [12]
<i>ND1</i>	MNCN-16S	GGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	F	San Mauro et al. [9]
	LatiMet	TCGGGGTATGGGCCCGAAAGCTT	R	San Mauro et al. [9]

Tabla 2. Distancias genéticas estimadas mediante el cálculo de la media no corregida para el gen *I6S*. Los valores bajo la diagonal corresponden a la media y desviación estándar. El número de individuos para cada comparación está mostrada sobre la diagonal. GE: grupo externo.

	<i>C. gracilis</i>	<i>C. volcani</i>	<i>C. tentaculata</i>	<i>C. nigricans</i>	<i>C. aff. nigricans</i>	<i>C. guntheri</i>	<i>C. carchense</i>	<i>C. buckleyi</i>	<i>C. aff. pachynema</i>	<i>C. pachynema</i>	<i>C. aff. pachynema</i>	<i>C. aff. leucocephala</i>	<i>C. tenuissima</i>	<i>C. leucocephala</i>	<i>C. sp. L</i>	<i>C. truncatus</i>	GE
<i>C. gracilis</i>		n=3	n=2	n=2	n=3	n=3	n=5	n=13	n=2	n=4	n=2	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	
<i>C. volcani</i>	0.111± 0.00		n=3	n=3	n=4	n=4	n=6	n=14	n=3	n=5	n=3	n=4	n=4	n=3	n=4	n=4	
<i>C. tentaculata</i>	0.115	0.113		n=2	n=3	n=3	n=5	n=13	n=2	n=4	n=2	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	
<i>C. nigricans</i>	0.140	0.123	0.137		n=3	n=3	n=5	n=13	n=2	n=4	n=2	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	
<i>C. aff. nigricans</i>	0.147± 0.001	0.133± 0.001	0.140± 0.004	0.059± 0.004		n=4	n=6	n=14	n=3	n=5	n=3	n=4	n=4	n=3	n=4	n=4	
<i>C. guntheri</i>	0.134± 0.005	0.121± 0.011	0.133± 0.002	0.085± 0.002	0.099± 0.014		n=6	n=14	n=3	n=5	n=3	n=4	n=4	n=3	n=4	n=4	
<i>C. carchense</i>	0.134± 0.007	0.114± 0.010	0.135± 0.010	0.075± 0.010	0.092± 0.005	0.040± 0.022		n=16	n=5	n=7	n=5	n=6	n=6	n=5	n=6	n=6	
<i>C. buckleyi</i>	0.133± 0.006	0.120± 0.008	0.136± 0.007	0.082± 0.007	0.101± 0.002	0.046± 0.004	0.035± 0.003		n=13	n=15	n=13	n=14	n=14	n=13	n=14	n=14	
<i>C. aff. pachynema</i>	0.130	0.122	0.131	0.089	0.099	0.083	0.080	0.083		n=4	n=2	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	
<i>C. pachynema</i>	0.128± 0.002	0.113± 0.003	0.131± 0.003	0.080± 0.00	0.091± 0.002	0.072± 0.003	0.081± 0.001	0.074± 0.001	0.059± 0.001		n=4	n=5	n=5	n=4	n=5	n=5	
<i>C. aff. pachynema</i>	0.122	0.116	0.134	0.088	0.092	0.087	0.072	0.079	0.071	0.035		n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	
<i>C. aff. leucocephala</i>	0.130± 0.001	0.103± 0.0	0.125± 0.0	0.132± 0.00	0.142± 0.005	0.128± 0.001	0.121± 0.003	0.131± 0.003	0.117± 0.002	0.117± 0.003	0.132± 0.002		n=4	n=3	n=4	n=4	
<i>C. tenuissima</i>	0.122± 0.010	0.106± 0.0	0.126± 0.0	0.131± 0.00	0.147± 0.00	0.128± 0.00	0.114± 0.00	0.128± 0.00	0.118± 0.00	0.112± 0.00	0.124± 0.00	0.077± 0.00		n=3	n=4	n=4	
<i>C. leucocephala</i>	0.108	0.060	0.108	0.105	0.110	0.109	0.115	0.114	0.112	0.103	0.119	0.093	0.095		n=3	n=3	
<i>C. sp. L</i>	0.118± 0.008	0.049± 0.002	0.115± 0.00	0.117± 0.00	0.116± 0.001	0.115± 0.001	0.104± 0.003	0.113± 0.002	0.109± 0.001	0.105± 0.00	0.105± 0.003	0.094± 0.00	0.094± 0.001	0.053± 0.001		n=4	
<i>C. truncatus</i>	0.122± 0.005	0.037± 0.002	0.122± 0.002	0.129± 0.002	0.137± 0.003	0.122± 0.003	0.120± 0.002	0.124± 0.001	0.132± 0.006	0.119± 0.004	0.121± 0.002	0.105± 0.004	0.104± 0.007	0.055± 0.00	0.039± 0.003		
GE	0.249± 0.004	0.253± 0.003	0.245± 0.003	0.244± 0.005	0.5± 0.008	0.246± 0.006	0.226± 0.006	0.246± 0.005	0.244± 0.008	0.244± 0.004	0.256± 0.004	0.252± 0.008	0.251± 0.010	0.261± 0.005	0.255± 0.007	0.266± 0.009	

Tabla 3. Medidas morfométricas de los especímenes en la filogenia presentada en la Figura 1. LT (longitud total), ACU (ancho del cuerpo), LC (longitud cefálica), AC (ancho cefálico), IO (distancia inter-orbital), LR (longitud del rostro), ON (distancia órbita-narina), TN (distancia tentáculo-narina), IN (distancia inter-narinas), IT (distancia inter-tentáculos).

Grupo Genético	LT	ACU	LT/ACU	LC	AC	IO	LR	ON	TN	IN	IT
<i>C. nigricans</i> n=1	442.00	7.67	57.63	10.42	9.02	5.80	5.6	3.23	1.36	2.74	3.46
<i>C. aff. nigricans</i> n=2	385—845 (615±325.27)	5.39—14 (9.70±6.09)	60.36—71.43 (65.89±7.83)	9.78—14.48 (12.13±3.32)	6.41—11.1 (8.76±3.32)	4.53—7.45 (5.99±2.06)	4.81—7.38 (6.10±1.82)	3.3—6.09 (4.70±1.97)	1.15—1.52 (1.34±0.26)	2.13—4.08 (3.11±1.38)	2.94—4.45 (3.70±1.07)
<i>C. guntheri</i> n=2	680—855 (767.50±123.74)	15.59—21.04 (18.31±3.85)	40.65—43.61 (42.13±2.10)	18.52—21.99 (20.26±2.45)	15.49—19.36 (17.43±2.74)	9.36—10.97 (10.17±1.14)	10.05—10.39 (10.22±0.24)	6.67—8.31 (7.49±1.16)	2.1—2.79 (2.45±0.49)	4.48—4.56 (4.52±0.06)	5.86—6.83 (6.35±0.69)
<i>C. carchense</i> n=4	178—683 (411.50±237.75)	5.92—12.88 (9.54±3.42)	30.08—56.65 (43.43±13.36)	7.74—12.77 (10.25±2.66)	5.98—11.39 (8.61±2.62)	3.44—6.25 (4.72±1.33)	2.83—6.06 (4.76±1.53)	1.87—4.01 (2.97±1.09)	0.75—1.41 (1.04±0.28)	2.1—3.12 (2.62±0.56)	2.48—5.19 (3.61±1.20)
<i>C. buckleyi</i> n=12	194—1166 (542.75±267.15)	4.22—16.74 (9.01±3.52)	41.99—82.01 (59.99±16.84)	6.42—22.27 (11.20±4.28)	5.03—17.55 (8.56±3.27)	2.8—11.3 (4.99±2.16)	2.47—10.19 (4.82±2.04)	1.5—8.04 (3.61±1.64)	0.6—3.01 (1.28±0.66)	1.45—6.18 (2.70±1.31)	1.8—8.17 (3.68±1.74)
<i>C. aff. pachynema</i> n=1	453.00	4.83	93.79	9.38	5.81	4.05	4.64	3.13	0.67	2.06	2.56
<i>C. pachynema</i> n=3	473—735 (628.67±137.79)	5.64—14.64 (8.86±5.01)	50.20—107.49 (80.51±28.79)	9.15—16.57 (11.77±4.16)	6.76—13.26 (9.00±3.69)	4.05—7.55 (5.26±1.98)	4.61—8.74 (6.00±2.37)	3.1—6.75 (4.33±2.09)	0.99—1.87 (1.34±0.47)	2.15—4.48 (2.99±1.29)	2.98—6.43 (4.18±1.95)
<i>C. aff. pachynema</i> n=1	355.00	6.37	55.75	8.82	6.24	4.01	4.44	2.91	1.08	2.06	2.87
<i>C. aff. leucocephala</i> n=2	215—240 (227.50±17.68)	4.94—5.05 (4.99±0.08)	43.57—47.57 (45.57±2.83)	5.64—7.15 (6.40±1.07)	4.1—4.75 (4.43±0.46)	2.19—2.5 (2.35±0.22)	1.94—2.96 (2.45±0.72)	1.16—1.71 (1.44±0.39)	0.4—0.69 (0.55±0.21)	1.19—1.35 (1.27±0.11)	1.36—1.6 (1.48±0.17)
<i>C. tenuissima</i> n=2	332—354 (343.00±15.56)	4.72—8.01 (6.36±2.32)	44.22—70.34 (57.28±18.47)	6.84—7.24 (7.04±0.28)	4.76—6.02 (5.39±0.89)	3.1—3.21 (3.16±0.08)	3.08—3.25 (3.17±0.12)	2.1—2.41 (2.26±0.22)	0.65—0.69 (0.67±0.03)	1.27—1.67 (1.47±0.28)	1.52—2.48 (2.00±0.68)
<i>C. leucocephala</i> n=1	172.00	3.81	45.14	6.20	4.28	2.52	2.54	1.77	0.72	1.27	1.47
<i>C. sp. L</i> n=2	154—604 (379.00±318.20)	4.40—16.39 (10.39±8.48)	35.00—36.86 (35.93±1.31)	8.5—18.9 (13.70±7.35)	5.28—14.4 (9.84±6.45)	3.12—9.62 (6.37±4.60)	3.06—8.79 (5.93±4.05)	2.01—7.29 (4.65±3.73)	0.86—2.44 (1.65±1.12)	1.56—4.74 (3.15±2.25)	1.95—5.7 (3.83±2.65)
<i>C. truncatus</i> n=2	118—390.3 (254.15±192.55)	4.8—12.81 (8.81±5.66)	24.58—30.47 (27.52±4.16)	6.15—13.06 (9.61±4.89)	4.73—10.95 (7.84±4.40)	2.99—6.27 (4.63±2.32)	2.5—6.68 (4.59±2.96)	1.75—4.94 (3.35±2.26)	0.48—1.85 (1.17±0.97)	1.36—3.36 (2.36±1.41)	1.68—4.53 (3.11±2.02)

Tabla 4. Caracteres diagnósticos del género *Caecilia* de la vertiente pacífica del Ecuador. Variación de los especímenes de las especies candidatas confirmadas de la filogenia. Las abreviaciones son: SP (surcos primarios), SS (surcos secundarios), SSC (surcos secundarios completos), Es (escudo temral), NV (número de vértebras).

Espece	SP	SS	SSC	NV	Es	Visibilidad del ojo	Patrón de coloración en etanol 75%	Morfología de la cabeza
<i>C. buckleyi</i>	149—172	0—6	0	155—177	conspicuo	visible	Gris dorsal uniforme con superficie ventrolateral de color gris claro a crema. Surcos de color gris oscuro.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. carchense</i>	138—160	9—15	2—3	146—168	conspicuo	visible	Gris oscuro dorsal con la región ventrolateral color crema, y la superficie medio ventral del color del dorso. Surcos color gris oscuro.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. guntheri</i>	127—129	7—19	0—1	132—135	conspicuo	visible	Gris oscuro uniforme. Cabeza y región ventral gris claro.	Punta del hocico acuminada en vista dorsal
<i>C. leucocephala</i>	118	52	6	126	inconspicuo	Vagamente visible	Cuerpo gris uniforme con cabeza distintivamente color beige claro.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. nigricans</i>	185	50	5	188	inconspicuo	visible	Gris uniforme con cabeza gris más claro.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. pachynema</i>	180—208	0	0	182—215	conspicuo	visible	Región dorsal y ventral gris oscuro, presenta dos bandas laterales de color crema amarillento muy notorio interrumpidas por los surcos de color gris oscuro.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. sp. L</i>	117—121	14—18	0	124—126	ausente	visible	Cuerpo marrón, con cabeza de color beige no muy distintiva del resto del cuerpo como en <i>C. leucocephala</i> . Manchas beige irregulares en el primer tercio del cuerpo.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. tenuissima</i>	151—171	8—10	0—2	157—178	inconspicuo	cubierto	Gris a café oscuro, vagamente más claro en la parte inferior de la cabeza y primer tercio del cuerpo. Flancos irregulares color crema no muy notorio en la parte anterior del cuerpo.	Punta del hocico redondeada en vista dorsal
<i>C. truncatus</i>	123	8	0	128	conspicuo	visible	Gris uniforme y vagamente gris más claro en cabeza y cuello, presenta dos bandas laterales de un color gris más claro que el resto del cuerpo, interrumpidas por los surcos de color gris oscuro.	Punta del hocico truncada en vista dorsal

Tabla 5. Cargas de nueve variables de un análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las especies del género *Caecilia* de la cuenca pacífica del Ecuador. Los valores en negrita corresponden a las cargas más altas.

VARIABLES	CP1	CP2
Ancho del cuerpo	0.96	-0.19
Longitud cefálica	0.97	-0.15
Ancho cefálico	0.98	-0.03
Distancia inter-orbital	0.96	-0.11
Longitud del rostro	0.96	-0.08
Distancia órbita-narina	0.92	-0.09
Distancia tentáculo-narina	0.91	0.32
Distancia inter-narinas	0.95	0.23
Distancia inter-tentáculos	0.94	0.13
Autovalores	8.12	0.26
Porcentaje de variación explicada %	90.24	2.9
Porcentaje de variación acumulada %	90.24	93.15

Material Suplementario

Tabla S1. Especímenes examinados pertenecientes al género *Caecilia* de la cuenca pacífica del Ecuador. Se provee información sobre el número de colección, localidad, y disponibilidad de genes secuenciados. Las abreviaciones son: BIO (Bosque Integral Otonga), secuencia disponible (x), No.SC (número de serie de campo).

Especie	QCAZ-A	No. SC	País	Provincia	Localidad	Genes mitocondriales		
						12S	16S	ND1
<i>C. buckleyi</i>	19964		Ecuador	Pichincha	Calacalí - Yunguilla		x	x
<i>C. buckleyi</i>	23784		Ecuador	Cotopaxi	7 Ríos vía la Maná	x	x	x
<i>C. buckleyi</i>	37733		Ecuador	Cotopaxi	Naranjito (BIO)	x	x	x
<i>C. buckleyi</i>	37851		Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito		x	x
<i>C. buckleyi</i>	40088		Ecuador	Pichincha	Reserva Las Galarias vía Calacalí - La Independencia	x	x	x
<i>C. buckleyi</i>	40104		Ecuador	Pichincha	Reserva Las Galarias vía Calacalí - La Independencia	x	x	x
<i>C. buckleyi</i>	43420	SC28659	Ecuador	Imbabura	Cuellaje, San Antonio	x	x	x
<i>C. buckleyi</i>	47029	SC32091	Ecuador	Pichincha	Tandayapa	x	x	x
<i>C. buckleyi</i>	49359	SC32464	Ecuador	Pichincha	Santa Lucía de Nanegal		x	x
<i>C. buckleyi</i>	54297		Ecuador	Pichincha	BIO		x	x
<i>C. buckleyi</i>	54298	SC40677	Ecuador	Pichincha	BIO		x	x
<i>C. buckleyi</i>	62840		Ecuador	Pichincha	Reserva de Bosque Nublado Bellavista, Tandayapa		x	x
<i>C. buckleyi</i>	1962		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas			
<i>C. buckleyi</i>	1967		Ecuador	Pichincha	Cerca de Chiriboga, Palmeras			
<i>C. buckleyi</i>	1973		Ecuador	Pichincha	Palmeras			
<i>C. buckleyi</i>	1974		Ecuador	Pichincha	Palmeras			
<i>C. buckleyi</i>	1975		Ecuador	Pichincha	Palmeras			
<i>C. buckleyi</i>	1976		Ecuador	Pichincha	Palmeras			
<i>C. buckleyi</i>	1985		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas y alrededores			
<i>C. buckleyi</i>	1988		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas y alrededores			
<i>C. buckleyi</i>	2695		Ecuador	Pichincha	Palmeras			
<i>C. buckleyi</i>	3887	FHGO372	Ecuador	Pichincha	La Favorita, Chiriboga			
<i>C. buckleyi</i>	4067		Ecuador	Pichincha	Palmeras			

Especie	QCAZ-A	No. SC	País	Provincia	Localidad	Genes mitocondriales		
						12S	16S	ND1
<i>C. buckleyi</i>	4236		Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito			
<i>C. buckleyi</i>	4956		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas y alrededores			
<i>C. buckleyi</i>	10135		Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito			
<i>C. buckleyi</i>	10342		Ecuador	Pichincha	Vía Quito-Chiriboga			
<i>C. buckleyi</i>	10721	AGG433	Ecuador	Imbabura	Cuellaje			
<i>C. buckleyi</i>	12443	JG135	Ecuador	Cotopaxi	BIO			
<i>C. buckleyi</i>	12856		Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito			
<i>C. buckleyi</i>	12857		Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito			
<i>C. buckleyi</i>	15567	SC3526	Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas Otonga			
<i>C. buckleyi</i>	15569	DFCH18	Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito			
<i>C. buckleyi</i>	16265	CP4126	Ecuador	Pichincha	Quebrada Zapadores			
<i>C. buckleyi</i>	16266	CP4127	Ecuador	Pichincha	Quebrada Zapadores			
<i>C. buckleyi</i>	21064		Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito			
<i>C. buckleyi</i>	45261	LAC2270	Ecuador	Pichincha	14,7 Km O Calacalí			
<i>C. guntheri</i>	1981		Ecuador	Cotopaxi	Las pampas y alrededores			
<i>C. guntheri</i>	1982		Ecuador	Cotopaxi	Las pampas y alrededores			
<i>C. guntheri</i>	1983		Ecuador	Cotopaxi	Las pampas y alrededores			
<i>C. guntheri</i>	1984		Ecuador	Cotopaxi	Las pampas y alrededores			
<i>C. guntheri</i>	1987		Ecuador	Cotopaxi	Las pampas y alrededores			
<i>C. guntheri</i>	1989		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas			
<i>C. guntheri</i>	2694		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas			
<i>C. guntheri</i>	7082		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas Otonga			
<i>C. guntheri</i>	11860	CP1180	Ecuador	Cotopaxi	Naranjito, Bosque Integral Otonga (BIO)			
<i>C. guntheri</i>	12949		Ecuador	Cotopaxi	Bosque Integral Otonga (BIO)			
<i>C. guntheri</i>	12950	JG211	Ecuador	Cotopaxi	Bosque Integral Otonga (BIO)			
<i>C. guntheri</i>	15210	SC3154	Ecuador	Pichincha	Manuel Cornejo Astotga	x	x	x

Especie	QCAZ-A	No. SC	País	Provincia	Localidad	Genes mitocondriales		
						12S	16S	ND1
<i>C. guntheri</i>	15568		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas Otonga	x	x	x
<i>C. guntheri</i>	30515		Ecuador	Cotopaxi	Bosque Integral Otonga (BIO)			
<i>C. guntheri</i>	56565	SC46270	Ecuador	Imbabura	Río Mandiruyacu, 7.5 km NNE Bellavista			
<i>C. leucocephala I</i>	17172	SC3658	Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo	x	x	x
<i>C. leucocephala I</i>	33313	SC19329	Ecuador	Esmeraldas	4 km norte de Durango	x	x	x
<i>C. leucocephala I</i>	48290		Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo, Bosque Integral Otokiki			
<i>C. leucocephala K</i>	47071	POE3090	Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo		x	
<i>C. leucocephala K</i>	40070		Ecuador	Esmeraldas	Guadual de Lita			
<i>C. leucocephala K</i>	47194		Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo, Bosque Integral Otokiki			
<i>C. leucocephala K</i>	48291		Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo, Bosque Integral Otokiki			
<i>C. nigricans</i>	37728		Ecuador	Esmeraldas	21Km de Durango vía al Rio San Francisco	x	x	x
<i>C. nigricans</i>	11055		Ecuador	Esmeraldas	Pichiyacu			
<i>C. pachynema</i>	31720		Ecuador	Azuay	San Antonio de Chaucha			
<i>C. pachynema</i>	33235		Ecuador	Azuay	Reserva Yunguilla, El Unión, cerca de Santa Isabel	x	x	
<i>C. pachynema</i>	46938	SC29988	Ecuador	Azuay	Río Chipla	x	x	x
<i>C. pachynema</i>	46983	SC29954	Ecuador	Azuay	Río Chipla	x	x	x
<i>C. aff. nigricans</i>	50736	SC31725	Ecuador	Manabi	Recinto La Chorrera		x	x
<i>C. aff. nigricans</i>	55456	SC41351	Ecuador	Manabi	Reserva Jama Coaque		x	x
<i>C. carchense</i>	39978	SC27359	Ecuador	Carchi	Chilmá Bajo	x	x	x
<i>C. carchense</i>	55100	SC43235	Ecuador	Carchi	km 19,5 vía El Chical-Gualchán		x	x
<i>C. carchense</i>	55101	SC43243	Ecuador	Carchi	Chilmá Bajo		x	x
<i>C. carchense</i>	55102	SC43244	Ecuador	Carchi	Chilmá Bajo		x	x
<i>C. aff. pachynema</i>	32405		Ecuador	Azuay	ND	x	x	x
<i>C. sp. L</i>	7146		Ecuador	Pichincha	A 5 km de Los Bancos, vía Quito-Los Bancos	x	x	
<i>C. sp. L</i>	31448	SC18541	Ecuador	Esmeraldas	Reserva Ecológica Bilsa	x	x	
<i>C. truncatus</i>	27774		Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo, El Placer, Río Carolina	x	x	

Especie	QCAZ- A	No. SC	País	Provincia	Localidad	Genes mitocondriales		
						12S	16S	ND1
<i>C. truncatus</i>	40305	SC24458	Ecuador	Esmeraldas	Alto Tambo, a 4 km al oeste de Alto Tambo	x	x	x
<i>C. aff. pachynema</i>	62959	SC53606	Ecuador	Azuay	Vía Camilo Ponce Enriquez-El Coca		x	x
<i>C. tenuisima</i>	23580	SC8475	Ecuador	Guayas	Alrededores Estación Cerro Masvale	x	x	x
<i>C. tenuisima</i>	42637		Ecuador	El Oro	Universidad Técnica de Machala	x	x	x
ND	4295		Ecuador	Esmeraldas	Lagarto Reserva Mayronga			
ND	1986		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas y alrededores			
ND	17917		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas y alrededores			
ND	30096		Ecuador	Cotopaxi	Las Pampas Otonga			
ND	33551		Ecuador	Cotopaxi	Peñas Coloradas			
ND	64560	SC55798	Ecuador	Carchi	Chical			

Tabla S2. Medidas merísticas y morfométricas tomadas para los especímenes del género *Caecilia* de la cuenca pacífica del Ecuador utilizados en la filogenia. SP (surcos primarios), SS (surcos secundarios), SSC (surcos secundarios completos), Es (escudo temrinal), NV (número de vértebras), LT (longitud total), ACU (ancho del cuerpo), LC (longitud cefálica), AC (ancho cefálico), IO (distancia inter-orbital), LR (longitud del rostro), ON (distancia órbita-narina), TN (distancia tentáculo-narina), IN (distancia inter-narinas), IT (distancia inter-tentáculos), P (papilas cloacales), dato no registrado (-), ligeramente visible (*), muy visible (**) y no visible externamente (x).

Espece	QCAZ-A	SP	SS	SSC	Es	NV	LT	ACU	LC	AC	IO	LR	ON	TN	IN	IT	P	OJO
<i>C. aff. leucocephala</i>	17172	149	54	10	No	154	240	5.05	5.64	4.1	2.19	1.94	1.16	0.4	1.19	1.36	No	**
<i>C. aff. leucocephala</i>	33313	143	55	13	No	149	215	4.94	7.15	4.75	2.5	2.96	1.71	0.69	1.35	1.6	No	*
<i>C. aff. nigricans</i>	50736	188	30	0	No	190	845	14	14.48	11.1	7.45	7.38	6.09	1.52	4.08	4.45	Sí	*
<i>C. aff. nigricans</i>	55456	167	32	7	No	173	385	5.39	9.78	6.41	4.53	4.81	3.3	1.15	2.13	2.94	Sí	*
<i>C. aff. pachynema</i>	32405	178	0	0	Sí	182	453	4.83	9.38	5.81	4.05	4.64	3.13	0.67	2.06	2.56	Sí	**
<i>C. aff. pachynema</i>	62959	175	0	0	Sí	182	355	6.37	8.82	6.24	4.01	4.44	2.91	1.08	2.06	2.87	No	**
<i>C. buckleyi</i>	19964	157	0	0	Sí	163	561	6.92	10.5	8.21	5.55	6.24	3.94	1.3	2.61	4.03	Sí	**
<i>C. buckleyi</i>	23784	149	0	0	Sí	155	194	4.22	6.42	5.03	2.8	2.47	1.5	0.6	1.45	1.8	Sí	**
<i>C. buckleyi</i>	37733	162	3	0	Sí	170	733	10.83	12.79	9.97	4.92	5.54	4.06	1.13	2.7	3.77	Sí	**
<i>C. buckleyi</i>	37851	160	0	0	Sí	169	473	6.27	6.67	6.31	4.04	2.97	-	-	-	-	No	**
<i>C. buckleyi</i>	40088	151	1	0	Sí	159	467	11.06	12.82	9.22	4.45	4.4	3.13	1.06	1.99	3.22	Sí	**
<i>C. buckleyi</i>	40104	158	2	0	Sí	165	312	7.43	9.68	7	3.53	4.01	2.8	-	-	-	No	**
<i>C. buckleyi</i>	43420	167	0	0	Sí	173	780	10.21	11.14	8.29	5.58	5.12	3.88	1.52	3.06	4.27	Sí	**
<i>C. buckleyi</i>	47029	162	6	0	Sí	169	266	5.11	7.69	5.19	3.6	2.96	2.51	0.81	1.82	2.62	No	**

Especie	QCAZ-A	SP	SS	SSC	Es	NV	LT	ACU	LC	AC	IO	LR	ON	TN	IN	IT	P	OJO
<i>C. buckleyi</i>	49359	153	4	0	Sí	159	388	8.51	8.33	7.3	4.03	3.85	3.04	0.96	2.08	2.51	Sí	**
<i>C. buckleyi</i>	54297	150	0	0	Sí	157	503	12.74	12.54	9.77	4.97	4.73	3.44	1.12	2.5	3.07	No	**
<i>C. buckleyi</i>	54298	152	0	0	Sí	160	670	8.17	13.5	8.89	5.08	5.31	3.37	1.25	2.61	3.34	No	**
<i>C. buckleyi</i>	62840	172	0	0	Sí	177	1166	16.74	22.27	17.55	11.3	10.19	8.04	3.01	6.18	8.17	Sí	**
<i>C. carchense</i>	39978	153	12	3	Sí	160	250	7.36	8.17	6.81	3.78	4.23	2.21	0.9	2.18	2.9	Sí	**
<i>C. carchense</i>	55100	138	15	2	Sí	146	535	12	12.3	11.39	6.25	5.92	3.8	1.08	3.08	5.19	Sí	**
<i>C. carchense</i>	55101	143	9	3	Sí	148	178	5.92	7.74	5.98	3.44	2.83	1.87	0.75	2.1	2.48	No	**
<i>C. carchense</i>	55102	160	13	2	Sí	168	683	12.88	12.77	10.24	5.41	6.06	4.01	1.41	3.12	3.87	Sí	**
<i>C. guntheri</i>	15210	127	7	0	Sí	132	855	21.04	21.99	19.36	10.97	10.39	8.31	2.1	4.56	6.83	Sí	**
<i>C. guntheri</i>	15568	129	19	1	Sí	135	680	15.59	18.52	15.49	9.36	10.05	6.67	2.79	4.48	5.86	Sí	**
<i>C. leucocephala</i>	47071	118	52	6	No	126	172	3.81	6.2	4.28	2.52	2.54	1.77	0.72	1.27	1.47	No	**
<i>C. nigricans</i>	37728	185	50	5	No	188	442	7.67	10.42	9.02	5.8	5.64	3.23	1.36	2.74	3.46	Sí	*
<i>C. pachynema</i>	33235	208	0	0	Sí	215	678	6.31	9.15	6.99	4.05	4.65	3.1	1.16	2.34	2.98	Sí	**
<i>C. pachynema</i>	46938	201	0	0	Sí	207	473	5.64	9.6	6.76	4.19	4.61	3.15	0.99	2.15	3.14	No	**
<i>C. pachynema</i>	46983	180	0	0	Sí	188	735	14.64	16.57	13.26	7.55	8.74	6.75	1.87	4.48	6.43	No	**
<i>C. sp. L</i>	7146	121	18	0	No	126	604	16.39	18.9	14.4	9.62	8.79	7.29	2.44	4.74	5.7	No	**
<i>C. sp. L</i>	31448	117	14	0	No	124	154	4.4	8.5	5.28	3.12	3.06	2.01	0.86	1.56	1.95	No	**
<i>C. tenuisima</i>	23580	171	8	0	Sí	178	354	8.01	7.24	6.02	3.21	3.25	2.1	0.69	1.67	2.48	Sí	x

Especie	QCAZ-A	SP	SS	SSC	Es	NV	LT	ACU	LC	AC	IO	LR	ON	TN	IN	IT	P	OJO
<i>C. tenuisima</i>	42637	151	10	2	Sí	157	332	4.72	6.84	4.76	3.1	3.08	2.41	0.65	1.27	1.52	No	x
<i>C. truncatus</i>	27774	123	8	0	Sí	128	390.3	12.81	13.06	10.95	6.27	6.68	4.94	1.85	3.36	4.53	No	**
<i>C. truncatus</i>	40305	123	8	0	Sí	128	118	4.8	6.15	4.73	2.99	2.5	1.75	0.48	1.36	1.68	No	**

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Thalía Elizabeth Arroba López, con CC. 180495804-7 autora del trabajo de graduación titulado: “Sistemática del género *Caecilia* (Gymnophiona: Caeciliidae) de la vertiente del Pacífico de Ecuador”, previa 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 titulación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 12 de julio de 2017

Thalía Elizabeth Arroba López

180495804-7