

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

Sistemática del complejo de especies *Hypsiboas fasciatus* (Günther, 1858) e *Hypsiboas calcaratus* (Troschel, 1848) (Anura: Hylidae)

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

MARCEL ADRIÁN CAMINER RODRÍGUEZ

Quito, 2010

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Marcel Adrián Caminer Rodríguez 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

2 de Noviembre de 2010

A mis padres, mi hermano y amigos
por darme su apoyo, cariño y confianza incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Santiago R. Ron, director de la disertación, por dame la confianza y oportunidad de realizar este trabajo y compartir sus valiosos conocimientos conmigo.

A Juan Manuel Guayasamin, Omar Torres, Luis Coloma, Elisa Bonaccorso, Ítalo Tápia, Amparito, David Salazar, Edwin Carrillo, Juan Dueñas, Elicio Tápia, Belén Baus, Pablo Menéndez, María Eugenia Ordoñez, Eduardo Toral, Mónica Páez y Sofía Carvajal por sus valiosas sugerencias y aporte en la elaboración de este trabajo.

A mis padres, a Jennyfer García, Diego Páez, Diego Morales, Daniel Chávez, David Terán, Fernanda Latorre, Gabriela Nicholls y Francy Mora por sus consejos, apoyo y enseñanzas, los cuales han sido de mucha utilidad en la elaboración de este trabajo y en mi vida personal.

Finalmente quedo agradecido al Ministerio de Ambiente por los permisos de colección otorgados para el año 2009, a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al proyecto SENACYT por el financiamiento en esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. HISTORIA TAXONÓMICA	3
3.1.1. <i>Hypsiboas calcaratus</i>	4
3.1.2. <i>Hypsiboas fasciatus</i>	5
3.2. ANTECEDENTES	6
3.3. OBJETIVOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN	8
4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	8
4.2.1. ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA	9
4.2.2. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA	9
4.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	10
4.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	10
4.4. ANÁLISIS DE LOS CANTOS DE ANUNCIO	12
5. RESULTADOS	14
5.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS	14
5.1.1. DISTANCIAS GENÉTICAS	16
5.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	16
5.2.1. VARIABLES MORFOMÉTRICAS	16
5.2.2. VARIABLES CUALITATIVAS	19

5.3. CANTOS DE ANUNCIO	20
5.3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CANTOS	20
5.3.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)	23
6. DISCUSIÓN	24
6.1. FILOGENIA Y LÍMITES ENTRE ESPECIES	24
6.2. DIVERGENCIA MORFOLÓGICA	27
6.3. DIVERGENCIA EN CANTOS DE ANUNCIO	28
6.4. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	30
7. LITERATURA CITADA	32
8. FIGURAS	38
9. TABLAS	62
10. ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

1. Filograma del análisis bayesiano de los genes combinados 12S, 16S y POMC	39
2. Árbol consenso regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y POMC.....	40
3. Filograma del análisis de inferencias bayesianas del fragmento del gen POMC	41
4. Mapa de las localidades muestreadas en este estudio.....	42
5. Diagrama de caja que compara la longitud rostro cloacal (LRC) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	43
6. Diagrama de caja que compara la longitud del pie (LP) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	44
7. Diagrama de caja que compara la longitud de la tibia (LTI) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	45
8. Diagrama de caja que compara la longitud del fémur (LFE) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	46
9. Diagrama de caja que compara el diámetro del tímpano (DT) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	47
10. Diagrama de caja que compara el tamaño del calcar (TC) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	48

11. Regresión lineal entre la variable longitud rostro cloacal (LCR) y el tamaño del calcar (TC) para los clados A, B, C, y D pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i> (machos)	49
12. Proyección de las variables morfométricas de machos adultos pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i> sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales	50
13. Proyección de las variables morfométricas de hembras adultas pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i> sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales	51
14. Vista dorso lateral de machos adultos pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	52
15. Vista dorso lateral de hembras adultas pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	53
16. Fotos que indican la forma del calcar en los clados A, B y C del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	54
17. Fotos que indican el patrón de coloración en los flancos y muslos de los diferentes clados pertenencias a complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	55
18. Fotos que comparan el grosor de las barras entre los clados A y B pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	56

19. Cantos de anuncio de los clados A, B, C y D perteneciente al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	57
20. Cantos de anuncio de los clados E y F perteneciente al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	58
21. Oscilogramas de cantos consecutivos perteneciente al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	59
22. Proyección de las variables acústicas sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	60
23. Holotipo de <i>Hypsiboas fasciatus</i>	61

LISTA DE TABLAS

1. Regiones de ADN y cebadores utilizados en este estudio.....	63
2. Protocolos para amplificar los genes mitocondriales y nucleares utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR)	64
3. Descripción de las variables morfométricas basada en Duellman (2001).....	65
4. Variables morfométricas obtenidas de machos adultos pertenecientes al complejo de especie <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	66
5. Variables morfométricas obtenidas de hembras adultas pertenecientes al complejo de especie <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	68
6. Fragmentos secuenciados por cada individuo colectado	70
7. Distancias genéticas p no corregidas de los genes combinados 12S y 16S entre los 6 clados y el grupo externo (<i>Hypsiboas lanciformis</i>).....	73
8. Resultados de los análisis de la prueba de t con la variable longitud rostro cloacal (LRC) entre clados (machos)	74
9. Resultados de los análisis de la prueba de t comparando la variable longitud rostro cloacal (LRC) entre machos y hembras de los diferentes clados del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	75
10. Resultados de los análisis de la prueba de t con la variable longitud del fémur (LFE) y longitud del pie (LP) entre los diferentes clados (machos)	76

11. Resultados de los análisis de la prueba de t con la variable longitud de la tibia (LTI) y diámetro del tímpano (DT)) entre los diferentes clados (machos)	77
12. Resultados del Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA) que muestra las comparaciones entre los sexos para cada clado	78
13. Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra el porcentaje de la variación aportado por dos componentes principales CP1 y CP2 de las variables morfométricas de individuos (machos) pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	79
14. Análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable morfométrica en machos pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	80
15. Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra el porcentaje de la variación aportado por los componentes principales en las variables morfométricas de individuos (hembras) pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	81
16. Análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable morfométrica en hembras pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	82
17. Resultados de los análisis de la prueba de t comparando dos componentes principales entre clados (machos)	83

18. Resultados de los análisis de la prueba de t comparando dos componentes principales entre clados (hembras).....	84
19. Descripción de caracteres morfológicos cualitativos (de acuerdo con lo definido por Duellman, 1973 y Faivovich, 2005) de los seis clados obtenidos en este estudio	85
20. Características de los cantos de anuncio de los seis clados.....	87
21. Análisis de Componentes Principales (ACP) que muestra el porcentaje de la variación aportado por los componentes principales para las variables acústicas en cantos de anuncio pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	89
22. Análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable acústica al PC 1 y PC 2 en individuos pertenecientes al complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	90
23. Distancias genéticas p no corregidas del gen 16S entre los 6 clados y el grupo externo (<i>Hypsiboas lanciformis</i>)	91
24. Resultados de los análisis de la prueba de t comparando las variables acústicas entre los clados A y B del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	92

LISTA DE ANEXOS

1. Lista de individuos colectados durante el estudio y depositados en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....	94
2. Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guanadina	99
3. Prueba estadística Kolmogorov-Smirnov para el análisis de la normalidad de las variables.....	101
4. Datos de recolección de los individuos grabados.....	102
5. Descripción de las variables temporales y espectrales obtenidas del análisis de los cantos de anuncio del complejo de especies <i>Hypsiboas calcaratus</i> - <i>H. fasciatus</i>	105

1. RESUMEN

Hypsiboas calcaratus e *H. fasciatus* son dos especies de ranas arborícolas con amplia distribución en la cuenca amazónica. Información genética de poblaciones de Guyana y Perú ha sugerido que se trata de un complejo de especies. En el presente trabajo se analiza el número de linajes a nivel de especies de las poblaciones de *H. calcaratus* e *H. fasciatus* en la amazonía ecuatoriana. Para ello, se examinaron conjuntamente la variación genética (secuencias de ADN mitocondrial y nuclear), morfológica y de cantos para establecer si existe correspondencia entre los diferentes grupos de datos. Los análisis genéticos generaron seis clados con buen soporte. Por otro lado, los datos morfológicos cualitativos presentan una buena correspondencia con los análisis moleculares. Se identificaron variables morfológicas cualitativas y cuantitativas útiles para diagnosticar los nuevos linajes evolutivos. Los cantos de anuncio también son característicos de cada clado y por lo tanto son congruentes con la información genética. La evidencia combinada sugiere que cada uno de los seis clados representa una especie única. Análisis del material tipo de *H. fasciatus* y de la descripción de *H. calcaratus* permitieron asignar formalmente ambos nombres a dos de los clados. Los cuatro clados restantes representan cuatro nuevas especies que están a la espera de ser descritas formalmente.

Palabras claves: cantos de anuncio; clados; cuenca amazónica; linajes evolutivos; material tipo; morfología; ranas arborícolas.

2. ABSTRACT

Hypsiboas calcaratus and *H. fasciatus* are two species of tree frogs that are widely distributed in the Amazon basin. Analysis of genetic information from Guyana and Peru populations has suggested that it is a species complex. This work analyzes the number of species-level lineages among populations of *H. calcaratus* and *H. fasciatus* from the Ecuadorian Amazon. With that aim, genetic (nuclear and mitochondrial DNA sequences), morphological and call variation were examined to establish whether there is correspondence among data sets. The genetic analyses resulted in six clades with good support. The qualitative morphological data showed correspondence with the molecular analyses. Quantitative and qualitative morphological characters were identified to diagnose the new evolutionary lineages. The advertisement calls are characteristic for each clade and thus are congruent with the genetic data. The combined evidence suggests that each of the six clades represent a single species. Analyses of the holotype of *Hypsiboas fasciatus* and the description of *Hypsiboas calcaratus* allowed to assign each name to one of the clades of the phylogeny. The remaining four clades represent four new species that are waiting to be formally described.

Keywords: advertisement calls; Amazon basin; clades, evolutionary lineages; holotype; morphological characters; tree frogs

3. INTRODUCCIÓN

Ecuador es uno de los países con mayor riqueza de especies de anfibios, con un total de 479 especies formalmente descritas (Coloma, 2005-2010); sin embargo, existen más especies de las reconocidas en la actualidad, ya que en muchos casos su identidad evolutiva parece no estar bien establecida (Angulo, 2002).

Para determinar y comprender la diversidad de anfibios se necesita una revisión sistemática integrada de la morfología, vocalización y estudios moleculares (Gerhardt, 1994; Bernal *et al.* 2004) en especies que presentan alta variabilidad fenotípica como es el caso del complejo de especies *Hypsiboas calcaratus*-*H. fasciatus* (Fouquet *et al.*, 2007).

3.1. HISTORIA TAXONÓMICA

El género *Hypsiboas* pertenece a la familia Hylidae. Este género fue resucitado por Faivovich *et al.* (2005), quienes trasladaron 70 especies anteriormente clasificadas en el género *Hyla* a *Hypsiboas*. Dentro de este género se encuentran las especies *Hypsiboas calcaratus* e *Hypsiboas fasciatus*. Duellman (1973) las asignó al grupo de especies *Hyla geographica* en base a caracteres morfológicos; sin embargo, en la filogenia presentada por Faivovich *et al.* (2005), se reubica a estas dos especies en el grupo *Hypsiboas albopunctatus* por compartir 43 transformaciones en secuencias de ADN nuclear y mitocondrial.

El grupo *Hypsiboas albopunctatus*, de acuerdo con la definición de Faivovich *et al.* (2005), contiene nueve especies formalmente descritas: *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824), *Hypsiboas calcaratus* (Troschel, 1848) *Hypsiboas dentei* (Bokermann, 1967), *Hypsiboas fasciatus* (Günther, 1858), *Hypsiboas heilprini* (Noble, 1923),

Hypsiboas lanciformis (Cope, 1871), *Hypsiboas leucocheilus* (Caramaschi y Niemeyer, 2003), *Hypsiboas multifasciatus* (Günther, 1859) e *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862).

3.1.1. *Hypsiboas calcaratus*

Hypsiboas calcaratus fue descrita por Troschel (1848). La localidad tipo es "Britisch-Guiana" (= Guyana). Según Duellman (1973), el cuerpo de esta distintiva especie es delgado y es muy fácil de reconocer tanto por su color como por el espolón puntiagudo dermal que posee en la articulación del talón, el cual es muy evidente y largo. Además, presenta las siguientes características: rostro puntiagudo en vista dorsal, ojos grandes y sobresalientes, membrana timpánica redondeada, diámetro del tímpano es la mitad de la longitud de los ojos. Los dedos de las manos solo tienen membrana basal, el dedo interior se encuentra libre de esta membrana, en los pies, las membranas interdigitales se extienden hasta la penúltima falange de cada dedo. En alcohol, el color es café-rojizo con una raya medio-dorsal café oscura que comienza desde la punta del hocico y termina en la mitad del sacro. El dorso tiene alrededor de siete rayas oscuras y cortas, transversales en relación a eje antero-posterior. En el muslo, tiene alrededor de ocho barras transversales oscuras. El tamaño máximo hocico-cloaca en machos es de 39.9 mm, y en hembras es de 55 mm. Los flancos son blancos o azules con manchas negras llamativas o con solo barras verticales. La superficie ventral del cuerpo es uniformemente blanca, con vientre amarillo (Duellman, 1973).

El holotipo de *H. calcaratus* parece estar extraviado (Duellman, 1973). De acuerdo con Duellman (1973), el énfasis de Troschel en el tamaño del calcar sugiere que la descripción no puede ser aplicada a *H. fasciatus*, la cual posee un tubérculo calcar más pequeño. Duellman (1973) también argumentó que el holotipo de *H. calcaratus* no podía ser conespecífico con *H. fasciatus* debido a que *H. fasciatus* estaba

ausente en la Guyana. Sin embargo, actualmente se asume que ambas especies son ampliamente simpátricas en esa región (Fouquet *et al.*, 2007). De acuerdo con Duellman (1973, 1978, 2005), la principal característica de *H. calcaratus* es la presencia de barras verticales en los flancos y el calcar. Por ello, tradicionalmente se ha aplicado el nombre *H. calcaratus* a individuos con esas características. De acuerdo con el Global Amphibian Assessment (IUCN, 2010), *H. calcaratus* se distribuye en las Guayanas, en el norte y centro de la cuenca Amazónica, en lo alto de la cuenca del Orinoco, y hacia la región oriental de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. La mayoría de registros pertenecen a localidades con altitudes menores a 500 m.

3.1.2. *Hypsiboas fasciatus*

Hypsiboas fasciatus fue descrita por Günther en 1858. La localidad tipo es “Andes del Ecuador” por lo que su localización precisa es desconocida. Duellman (1973) describe a esta especie con un tamaño máximo hocico-cloaca de 36.1 mm en machos y 50.0 mm en hembras, con membranas vestigiales en las manos, y con membranas interdigitales que se extienden hasta la penúltima falange de cada dedo de los pies. El calcar es pequeño, alargado y cónico. El dorso es amarillo pálido, con una raya oscura medio-dorsal, los flancos blancos o con manchas negras. La superficie posterior de los muslos es pálida o gris con manchas negras o barras verticales, mientras que la parte ventral de los muslos es blanca con o sin motas negras. El vientre es blanco amarillento con motas negras en el pecho y cuello. El iris es de color plata crema (Duellman, 1973). De acuerdo con el Global Amphibian Assessment (IUCN, 2010), esta especie se distribuye hacia el Norte de la cuenca Amazónica en las Guayanas, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil, por debajo de los 450 m.

3.2. ANTECEDENTES

Hay varias líneas de evidencia que sugieren que *H. calcaratus* e *H. fasciatus* son complejos de especies. Fouquet *et al.* (2007) determinó mediante una filogenia molecular que individuos de varias localidades pertenecientes a *H. calcaratus* difieren entre sí en 6%, e individuos pertenecientes a la especie *H. fasciatus* en un 3%. Por lo tanto, se aplicó el estatus de “especie candidata” a cada uno de estos linajes. Además, existen grabaciones de cantos de anuncio de *H. calcaratus* e *H. fasciatus* realizadas por Read (2000) en la amazonía ecuatoriana que muestran cuatro tipos de canto marcadamente diferentes. En conclusión, estos dos estudios sugieren la existencia de más de dos linajes independientes dentro de este complejo de especies denominado *Hypsiboas calcaratus-H. fasciatus*.

En el presente trabajo se infirió las relaciones filogenéticas de *H. fasciatus* e *H. calcaratus* en base a secuencias de los genes mitocondriales 12S rDNA, 16S rDNA y porciones del gen nuclear proopiomelanocortin A (POMC). Combinando la filogenia resultante con análisis acústicos y de caracteres morfológicos se identificó cuatro especies nuevas y se definió los límites para la aplicación de los binomiales *H. fasciatus* e *H. calcaratus*.

3.3. OBJETIVOS

- Analizar relaciones filogenéticas y filogeográficas para establecer si el complejo de especies *Hypsiboas calcaratus-H. fasciatus* son dos o más especies.
- Cuantificar y tipificar la variabilidad genética a nivel de especies y poblaciones del complejo de especies *Hypsiboas calcaratus-H. fasciatus*.
- Contrastar los resultados de los análisis moleculares con los estudios taxonómicos anteriores de *H. fasciatus* e *H. calcaratus*.

- Examinar la variación morfológica y acústica del complejo de especies *Hypsiboas calcaratus*-*H. fasciatus* y su relación con la variación genética.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN

El ADN fue extraído de tejidos (hígado y músculo) preservados en etanol al 95% de individuos recolectados en el campo y disponibles en el Museo de Zoología (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo 1). Se utilizó el protocolo de M. Fujita (no publicado) con algunas modificaciones realizadas por M. E. Ordoñez (Anexo 2). Después de extraer el ADN se amplificaron los segmentos de los genes mitocondriales 12S ARNr y 16S ARNr y porciones del gen nuclear proopiomelanocortin A (POMC) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se realizaron con un volumen final de 25 µl que contenía: 2.5 µl de Buffer PCR 5X, 1.5 µl de MgCl₂ 50mM, 0.5 µl de cada primer 10uM, 0.5 µl de dNTPs 10mM, 0.25 µl de Taq polimerasa, 1 unidad de ADN y 18.25 µl de dH₂O. Los cebadores y protocolos utilizados se presentan en las Tablas 1 y 2. Se utilizaron los mismos cebadores y protocolos para la secuenciación. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0.7% y se utilizó el kit de purificación ExoSap-IT (GE Healthcare) para eliminar los residuos de primer y dNTPs no incorporados. Una vez purificados los productos, se realizó la secuenciación en la empresa Macrogen en Korea (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los datos de las secuencias de ambos cebadores (derechas y reversas) fueron comparados para generar una secuencia consenso para cada fragmento de ADN utilizando el programa Sequencer 4.8. (Gen Codes Corp., 2000). Las secuencias fueron inicialmente alineadas en el programa CLUSTALX 2.0 (Larkin *et al.*, 1997) y

posteriormente ajustadas manualmente en MacClade 4.08 (Maddison y Maddison, 2000).

Se hicieron tres análisis filogenéticos, cada uno bajo los criterios de optimalidad de máxima parsimonia e inferencia Bayesiana: (1) genes de ARNr 12S y 16S, (2) POMC y (3) 12S, 16S y POMC. Como grupo externo se utilizó a *Hypsiboas lanciformis*, una especie cercanamente relacionada (Faivovich *et al.*, 2005).

4.2.1. ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA

El análisis de Máxima Parsimonia se realizó en el programa Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP 4.0) (Swofford, 2002), con el algoritmo de permutación de ramas (*branch-swapping*) y con la metodología de purga de cladogramas de bisección-reconexión de árboles (TBR). Para la búsqueda heurística se implementaron 100.000 árboles con adición aleatoria al árbol inicial de 100 replicas. El soporte para cada nodo se evaluó con la técnica de *bootstrap* utilizando 500 réplicas con el tipo de búsqueda de Adición Progresiva Rápida. Se obtuvo el árbol consenso con regla de mayoría del 50%.

4.2.2. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA

Para este análisis se utilizó el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se utilizó el criterio de información Akaike (AIC) del programa JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) para determinar el mejor modelo evolutivo para cada una de cinco particiones: (1) gen 12S ARNr, (2) gen 16S ARNr, (3) primera posición de los codones de POMC, (4) segunda posición de los codones de POMC, y (5) tercera posición de los codones de POMC.

Se corrieron dos análisis independientes utilizando el algoritmo de la cadena Markov de Monte Carlo con cuatro cadenas por 10.000.000 generaciones. Se utilizó el programa TRACER v1.3 para monitorear los valores de verosimilitud y confirmar que han alcanzado una asíntota, y se descartaron los primeros 5.000 (50%) árboles (burn in).

4.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

Los caracteres cualitativos utilizados para las diagnosis se basaron principalmente en Duellman (1973), Faivovich *et al.* (2005) y referencias citadas en estos artículos. Se examinó: (1) el tamaño y forma del calcar (triangular o cónico), (2) coloración del dorso y vientre, (3) presencia o ausencia de motas negras en el pecho y cuello, (4) coloración de los flancos y coloración de las superficies no expuestas de los muslos (barras o manchas oscuras), y (5) coloración en vida del iris.

Sólo se utilizaron adultos; los machos fueron considerados adultos si tenían espina prepólica y/o saco bucal dilatado; las hembras fueron consideradas adultas si tenían óvulos maduros y/o los oviductos curvados.

4.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Se aplicó el Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA) a nueve medidas morfométricas (Tabla 3). Para la obtención de las medidas en los individuos adultos, se aplicó el sistema de medición de Duellman (2001). Se midieron 164 adultos (31 hembras y 133 machos; Tablas 4 y 5) de la colección del Museo de Zoología (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y el holotipo de *H. fasciatus* perteneciente al Museo Británico en Londres (BM 58.4.25.22). Los ejemplares revisados están listados en el Anexo 1. Cada medida fue

tomada tres veces en cada espécimen y el valor reportado fue el promedio de las tres medidas. Todos los especímenes fueron medidos por el autor excepto el holotipo (medido por S. R. Ron). Las medidas fueron tomadas con un calibrador digital marca Tresna (precisión 0.01 mm). Los datos fueron sometidos a una transformación logarítmica y luego se obtuvieron los residuos de la regresión de todas las variables con LRC. Se removió el efecto del tamaño mediante regresiones lineales entre el LRC y las demás medidas, para obtener los residuales en los que se aplicó los ACPs; este procedimiento se lo realizó por separado para las medidas de los machos y para las medidas de las hembras.

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los residuales y establecer que cumplan con los supuestos para el análisis multivariado (Anexo 3). Se excluyó la medida del diámetro del ojo, debido a las malas condiciones de los ejemplares medidos; así que se sólo se trabajó con ocho variables. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa SPSS ® (2009, Versión 17.0 para Windows).

Para evaluar la diferencia morfométrica entre sexos en cada clado, se realizó un Análisis Multivariado de Varianza. Posteriormente se realizó otro análisis de los seis clados en conjunto, considerando la interacción sexo-especie.

Finalmente, se compararon variables individuales entre clados mediante pruebas de t de Student. Se utilizaron los valores de los dos componentes principales (CP1 y CP2) de los Análisis de Componentes Principales para caracteres morfométricos en machos y en hembras, y se procedió a la comparación entre los seis clados. Antes de proceder a los análisis comparativos de la prueba de t , se evaluó la distribución normal de los componentes principales.

4.4. ANÁLISIS DE LOS CANTOS DE ANUNCIO

Se obtuvieron los cantos de anuncio pertenecientes al complejo de especies *Hypsiboas calcaratus*-*H. fasciatus* de las localidades: Estación Científica Yasuní PUCE, Comunidad Santa Rosa, Jatun Sacha, Tena, La Pradera y Zamora.

Para la grabación de los cantos se utilizó una grabadora Marantz PMD660 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, tratando de localizar al animal para su posterior recolección. Se tomaron datos de temperatura, humedad relativa, hora, fecha y lugar donde cantó el individuo. En total se obtuvieron las grabaciones de los cantos de anuncio de 25 individuos que representan a los seis clados obtenidos en este estudio. La información de los especímenes grabados se presenta en el Anexo 4. Los cantos están depositados en la colección de audio del museo QCAZ identificados por el número QCAZ correspondiente al individuo grabado y colectado.

Los oscilogramas, espectrogramas y espectros fueron editados y realizados con el programa Raven Pro, versión 1.3 (Cornell Lab of Ornithology, 2003-2008). El espectrograma fue generado mediante una transformación Fourier directa (DFT) a partir de una muestra de 2048 puntos y una resolución de frecuencia de 10.8 Hz. Los cantos fueron digitalizados a una tasa de muestro de 44,1 KHz y una resolución de 16 bit.

Para este trabajo se denominó “canto” a una secuencia estereotipada de notas; una “nota” sería la unidad de sonido constituida por uno o más pulsos, producidos durante un solo ciclo de flujo de aire (McLister *et al.*, 1995); mientras que “pulso”, es el resultado pasivo del flujo del aire a través de la laringe (McLister *et al.*, 1995).

Los parámetros analizados fueron: duración de la llamada (DI), notas por llamado (NI), la frecuencia dominante del llamado (Fdl), frecuencia fundamental del llamado (Ffl), tiempo de subida del llamado (Tsl), frecuencia dominante de la tercera

nota (Fdn), frecuencia fundamental la tercera nota (Ffn), número de pulsos por nota (Npn), tasa de repetición por pulsos (Trp) (Duellman y Trueb, 1994). En el Anexo 5 se provee información más detallada de cada parámetro utilizado.

Para los análisis de las variables acústicas se escogieron parámetros presumiblemente homólogos y compartidos por todos los individuos; estos fueron: duración de la llamada (Dl), notas por llamado (Nl), la frecuencia dominante del llamado (Fdl), frecuencia fundamental del llamado (Ffl), tiempo de subida del llamado (Tsl). Además se analizó otro tipo de canto adicional para el clado F, que se distingue del canto común.

Debido a que las variables del canto pueden estar afectadas principalmente por la temperatura del ambiente (Gerhardt y Huber, 2002), los datos fueron sometidos a una regresión de todas las variables homólogas (con excepción del número de notas) con la temperatura. Los análisis mostraron una falta de correlación entre la temperatura y todas las variables por lo que no se aplicaron correcciones adicionales. La falta de correlación puede ser consecuencia del rango relativamente pequeño de temperaturas registradas durante las grabaciones (21.5–25 °C).

5. RESULTADOS

5.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS

En total se obtuvieron las secuencias de 109 individuos para los genes mitocondriales 12S (~881 pb) y 16S (~832 pb), y para el gen nuclear POMC (~606 pb), incluyendo el grupo externo ($n = 7$) (Tabla 6).

Para el análisis del gen mitocondrial 12S se utilizó el modelo GTR + I + G y para el gen mitocondrial 16S se utilizó el modelo GTR + G. El análisis filogenético para el gen nuclear POMC se realizó con tres particiones: (1) Codón 1 con el modelo HKY + G, (2) Codón 2 con el modelo F81 y (3) Codón 3 con el modelo F81.

En la filogenia resultante de genes combinados 12S, 16S y POMC bajo el criterio de Inferencia Bayesiana (Fig. 1) se identificaron dos clados basales y alopátricos con un soporte estadístico muy alto. El primero está conformado por 4 clados (A, B, C y D) y el segundo por los clados E y F.

El análisis de parsimonia para los genes combinados 12S, 16S y POMC dio como resultado un árbol de 871 pasos, con un índice de consistencia de 0.63 y un índice de retención de 0.96 (Fig. 2). De los 2324 caracteres moleculares, 1859 son invariables y 365 son parsimónicamente informativos. La topología del árbol es congruente con la topología Bayesiana pues hay soporte robusto para los mismos clados basales (Fig. 1) y también para los clados A, B, C, D, E y F. La diferencia principal es que no hay resolución en las relaciones entre los clados A, B, y C.

Para la filogenia con el gen nuclear POMC bajo el criterio de Inferencias Bayesianas (Fig. 3) no hay una buena resolución filogenética pero se puede rescatar a los clados D y F con un buen soporte estadístico y también algunos individuos pertenecientes al clado E. Además, se puede destacar que los mismos clados basales están presentes tanto en el análisis bayesiano como en el de parsimonia.

La topología de la filogenia resultante de los genes individuales y de los dos genes mitocondriales combinados es idéntica a la topología para todos los genes combinados (12S, 16S y POMC) bajo los criterios de máxima parsimonia e inferencias Bayesianas (Fig. 1 y 2) por lo que no se muestran las figuras. A continuación describo los principales grupos genéticos recuperados en las filogenias.

CLADO BASAL 1:

El primer subclado que forma parte de este clado es A, el cual comparte su ancestro común con el subclado B, lo que nos indica que están cercanamente emparentados. El subclado A se distribuye en las provincias de Zamora Chinchipe y Morona Santiago; mientras que el subclado B se encuentra en Morona Santiago, Tungurahua y Napo. Geográficamente, ambos clados se encuentran restringidos al sur-oriente del Ecuador, en la cordillera de los Andes y con un rango altitudinal que va de 700 m a 1600 m (Fig. 4).

El tercer clado que se puede obtener de esta filogenia, es el clado C que comparte su ancestro común con los clados A y B.

Finalmente, el clado D forma un grupo monofilético con los clados A, B y C que excluye a E y F. El clado D es simpátrico con el clado C en las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos; sin embargo el clado D está ausente en la provincia de Pastaza donde sí está presente el clado C.

CLADO BASAL 2:

Los clados E y F están conformando el segundo grupo, el cual geográficamente se encuentra ubicado al nororiente del Ecuador. El clado E se distribuye exclusivamente en las provincias de Orellana y Sucumbíos; mientras que para el clado F existe un registro único en la Comunidad Santa Rosa (Provincia del Napo) (Fig. 4).

5.1.1. DISTANCIAS GENÉTICAS

Las distancias genéticas entre los diferentes clados obtenidos en este estudio se presentan en la Tabla 7. Para los genes mitocondriales 12S y 16S, las distancias no corregidas p estuvieron en un rango de 0.033–0.045 (entre los clados A y B), 0.038–0.091 (para los clados B y C) y 0.081–0.097 (entre el clado C y D); mientras que para los clados E y F, se obtuvieron distancias de 0.026–0.034.

5.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

5.2.1. VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Al revisar y comparar las variables morfométricas de los individuos pertenecientes al complejo de especies *Hypsiboas calcaratus*-*H. fasciatus*, se ha encontrado que existe variación de tamaño entre los diferentes linajes evolutivos.

La prueba de t realizada con la variable longitud rostro-cloacal permitió determinar diferencias en el tamaño corporal entre clados. La Tabla 8 muestra que los individuos del clado A, B, C y D son diferentes a los del clado E y F; mientras que los clados A y B también son diferentes entre sí.

Además hubo dimorfismo sexual en LRC en cada uno de los clados analizados (A–E; Tabla 9). En las Figuras 5 al 10, se muestran diagramas de variables morfométricas representativas. Los individuos de mayor LRC pertenecen al clado B y C; los de tamaño medio al clado A y D y los más pequeños al clado F (Fig. 5).

Para las variables morfométricas que representan las medidas de las extremidades, se ha encontrado que el clado C es el que posee extremidades más largas; mientras que el clado D tiene las extremidades más cortas. Por otra parte, los individuos que poseen el diámetro del tímpano más grande son los del clado F. En las Tablas 10 y

11 se presentan los tests que comparan estas variables entre clados.

El tamaño del calcar es un buen carácter para identificar a algunos de los linajes evolutivos pertenecientes al complejo de especies *Hypsiboas calcaratus*-*H. fasciatus*. En la Figura 10, se indica el diagrama de la variable del tamaño del calcar para cada uno de los clados de este estudio. La proporción calcar/fémur es la siguiente: (A) $\bar{x} = 7.24\% \pm 0.87$; (B) $\bar{x} = 7.81\% \pm 1.23$; (C) $\bar{x} = 10.61\% \pm 1.65$; y (D) $\bar{x} = 8.76\% \pm 1.68$. En la Figura 11 se muestra que los individuos del clado C son los que poseen un mayor tamaño del calcar.

Los conglomerados que se formaron en base a la morfometría de las poblaciones son consistentes con los clados obtenidos en la filogenia. El MANOVA para los seis linajes evolutivos arrojó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) entre clados y sexos. También se encontró diferencias significativas al comparar los sexos dentro de cada clado (Tabla 12). Al tomar en cuenta estos resultados, se determina que existe dimorfismo sexual independiente del tamaño. Por consiguiente, los datos para machos y hembras fueron separados en análisis posteriores.

En el ACP de los machos se obtuvieron dos componentes con Eigenvalues > 1 . Ambos explican el 60% de la variación total (Tabla 13 y 14). El primer componente principal (40,81% de la variación) está positivamente correlacionado con la medida del largo de la tibia (LTI), el largo del fémur (LFE) y el largo del pie (LP); mientras que el segundo componente (19,64% de la variación total) está positivamente correlacionado con el diámetro del tímpano (DT). La proyección de los individuos sobre el CP1 y el CP2 (Fig. 12) no muestra grupos muy bien marcados, al contrario existe un gran nivel de solapamiento entre los seis clados. Pero existe una tendencia del clado F, marcado por el segundo componente principal, que lo separa levemente del resto de clados por tener el diámetro del tímpano de mayores proporciones. Además, el primer componente

principal indica que los individuos pertenecientes al clado D poseen las extremidades cortas; mientras que los del clado C, tienen, en promedio, las extremidades largas (Fig. 12).

Por otro lado, el ACP realizado para las medidas de las hembras dio como resultado dos componentes con Eigenvalues > 1 . En conjunto los dos componentes explican el 60% de la variación total (Tablas 15 y 16). El primer componente principal (38,3% de la variación) está positivamente correlacionado con la medida del largo de la cabeza (LC), ancho de la cabeza (AC) y diámetro del tímpano (DT), mientras que el segundo componente (21,73% de la variación) está positivamente correlacionado con el largo del pie (LP). Los resultados muestran una separación entre los clados B y C, marcada por el primer componente principal (medidas de la cabeza); mientras que el segundo componente principal, nos indica que los individuos pertenecientes al clado D poseen un largo del pie de menor proporción (Fig. 13).

La prueba de t permitió determinar qué caracteres, de acuerdo a los componentes principales, son diferentes entre los clados. En la Tablas 17 y 18 se indica la significación estadística entre las comparaciones de los componentes principales tanto de machos como de hembras para cada clado.

El primer componente (CP1) en individuos machos, que está relacionado con la medida de longitud de las extremidades, nos indica que el clado A se diferencia de C y E; el clado B es diferente de C y E; el clado C es altamente significativo (< 0.001) con respecto a D, E y F; y que los clados cercanamente emparentados E y F también presentan significación.

Para el segundo componente (CP2) en individuos machos, el cual está influenciado primordialmente por la medida del diámetro del tímpano, los resultados muestran que el clado F se diferencia de los demás clados; el clado D es diferente a C y

A; mientras que el clado B muestra diferencias con A.

En cuanto a la comparación de los componentes principales para cada clado con respecto las hembras: el CP1 (medidas de la cabeza) nos indica que existe significación entre el clado A y B; mientras que para el componente CP2 (largo del pie) el clado D se diferencia de A y C, y el clado E presenta significación con D.

5.2.2. VARIABLES CUALITATIVAS

Se han encontrado variables cualitativas que han ayudado a identificar a los nuevos linajes evolutivos (Tabla 19). Los estados de estas variables se repiten en individuos de diferentes localidades y pertenecientes a un mismo clado.

El clado A se caracteriza por poseer una franja rojiza en el iris, carácter que lo distingue de los demás clados (B, C, D, E y F) que poseen una franja amarillenta en lugar de la rojiza (véase en la Fig. 14A y 15A). Los clados A, B y C poseen barras transversales oscuras en los flancos y en las extremidades posteriores. Pese a que los tres clados son muy parecidos morfológicamente, hay caracteres que los diferencian. Entre estos está la forma del calcar: (A) cónico; (B) cónico y alargado; (C) triangular y alargado (Fig. 16). También se han encontrado diferencias en los patrones de coloración de los flancos y muslos entre los clados A y B (Fig. 17A–D), ya que las barras verticales presentes en el clado A son de un mayor grosor ($\bar{x} = 8.58\% \pm 1.56$ proporción barra/fémur); mientras que en el clado B las barras son más claras y menos gruesas ($\bar{x} = 5.05\% \pm 0.61$ proporción barra/fémur) (Fig. 18).

El clado D se caracteriza por un calcar triangular y un patrón de coloración de manchas oscuras en los flancos y los muslos. (Fig. 14D y 17F). Para los clados cercanamente emparentados (E y F) y con una divergencia genética menor en comparación a los otros clados, no se han encontrado caracteres morfológicos

cualitativos que ayuden a diferenciarlos a pesar de que sus cantos de anuncio son muy diferentes (Fig. 20). Por el contrario, ambos clados presentan un patrón de coloración punteado en los flancos y muslos; además, poseen pequeñas motas cafés distribuidas uniformemente en el pecho y el cuello (Fig. 14E-F y 17G-H).

Existe muy poca variación de coloración de dimorfismo sexual (Figs. 14 y 15). En algunos casos, los machos poseen barras transversales grises oscuras con bordes difusos en los flancos y muslos (clados A, B y C); mientras que en las hembras las barras son negras oscuras con los bordes definidos y presentan pequeñas manchas azules que acompañan a cada una de las barras.

En otros casos, los machos tienen manchas y puntos oscuros en los flancos y muslos (clado D, E y F); mientras que en las hembras, estas manchas aumentan su volumen y están acompañadas de una coloración azul.

5.3. CANTOS DE ANUNCIO

5.3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CANTOS

Las Figuras 19, 20 y 21 nos muestran los oscilogramas y espectrogramas de los cantos de anuncio para cada uno de los clados. En cuanto a los análisis acústicos, en la Tabla 20 se resume las características de cada canto, en donde se indica la media, desviación estándar y el rango de cada medida.

A continuación se describe los cantos de anuncio para cada clado:

Clado A

Los individuos fueron grabados en el poblado La Pradera (Provincia Morona Santiago) y en Zamora (Provincia Zamora-Chinchipe). Se encontraban cantando en agrupaciones, en zonas inundadas de bosque secundario y perchando a unos ~20cm del

suelo. El canto consiste de tres a cinco notas, cada una de las cuales suena como un “cuac”. La duración media del llamado es de 0.52 ± 0.24 s ($n = 5$) y del tiempo de subida 0.24 ± 0.06 s. Las frecuencias presentan un aumento desde el inicio al final de la nota, los promedios oscilan entre 1855.81 ± 148.08 Hz para la frecuencia dominante y 884.89 ± 105.52 Hz para la fundamental.

Clado B

Las grabaciones fueron realizadas en el poblado Limón Indanza (Provincia Morona Santiago). Los individuos ($n = 5$) se encontraban cantando en coros en zonas de pastizales y perchando a unos ~50cm del suelo. El canto consiste de tres a cinco notas, cada una de las cuales suena como un “cuac”; pero a diferencia del clado A, este canto se escucha más agudo. Tiene una duración media de 0.48 ± 0.07 s y 0.30 ± 0.10 s de tiempo de subida. Las frecuencias presentan un aumento desde el inicio al final de la nota, la frecuencia dominante promedio es 1954.43 ± 128.43 Hz y la fundamental 884.89 ± 105.52 Hz.

Clado C

Las grabaciones fueron realizadas en la Estación Científica Yasuní de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Provincia Orellana) y en el Tena (Provincia Napo). Los individuos ($n = 7$) cantaban en coros en los márgenes de riachuelos y lagunas de zonas de bosque primario o secundario, perchando a unos ~50cm del suelo. El canto consiste de un solo “cuac” con duración promedio es 0.05 ± 0.00 s (la más baja entre los clados) y 0.04 ± 0.01 s para el tiempo de subida. Las frecuencias permanecen constantes y varían entre 1780.50 ± 112.73 Hz para la frecuencia dominante y 557.13 ± 46.21 Hz para la fundamental.

Clado D

Se obtuvo la grabación de un solo individuo en la Comunidad Santa Rosa (Provincia Napo). El individuo se encontraba cantando al borde de la carretera en bosque secundario, perchando en una rama a unos ~2m del suelo. El canto consiste en tres a cuatro notas muy seguidas, cada una de las cuales suena como un “nia”. La duración promedio del canto es 0.35 ± 0.04 s y 0.19 ± 0.1 s para el tiempo de subida. El valor de la frecuencia dominante es el más alto entre los clados 2217.93 ± 56.94 Hz y el más bajo para la frecuencia fundamental 488.10 ± 12.47 Hz.

Clado E

Los individuos ($n = 3$) fueron grabados en la Estación Científica Yasuní de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se encontraban cantando en agrupaciones, en zonas inundadas de bosque primario y perchando a unos ~50 cm del suelo. El canto tiene cinco notas, y suena como un “triil” con una duración promedio de 0.20 ± 0.05 s y 0.07 ± 0.03 s de tiempo de subida. Las frecuencias permanecen constantes y varían entre 2079.53 ± 83.43 Hz para la frecuencia dominante y 2036.31 ± 130.30 Hz para la fundamental

Clado F

Las grabaciones fueron realizadas en la Comunidad Santa Rosa (Provincia Napo), en zonas inundadas de bosque secundario. Los individuos ($n = 3$) se encontraban cantando en agrupaciones, perchando alrededor de unos ~50cm del suelo. Se describe dos variaciones de cantos, ambos con una sola nota: (1) es el más frecuente, suena como un silbido, tiene una media de duración de 0.10 ± 0.02 s y 0.03 ± 0.02 s de tiempo de subida (correspondiente al más bajo entre los clados). Las frecuencias permanecen

constantes y varían entre 1938.47 ± 26.24 Hz para la frecuencia dominante y 1940.14 ± 28.29 Hz para la fundamental; (2) se presenta muy raras veces, suena como un “crac”, con una media de duración del llamado 0.11 ± 0.02 s y 0.05 ± 0.02 s de tiempo de subida. La frecuencia dominante (1829.12 ± 12.61 Hz) y la fundamental (1821.96 ± 16.96 Hz) permanecen constantes.

5.3.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

Los resultados obtenidos del ACP muestran dos componentes principales (CP) que explican en conjunto el 72.75% de la variación total (Tablas 21 y 22). El CP1 (46,27% de la variación explicada) pertenece a la duración de la llamada (DI), el CP2 (26,47% de la variación explicada) nos indica el número de notas por llamado (NI) y la frecuencia dominante del llamado (Fdl).

La proyección de los individuos sobre el CP1 y el CP2 muestra grupos separados definidos tanto por el primer componente como por el segundo, con la excepción de los clados A y B los cuales se encuentran solapados (Fig. 22). El CP1 separa a los individuos del clado E por tener una mayor duración del llamado que los demás clados; mientras que el CP2, que se encuentra relacionado con la frecuencia dominante del llamado y el número de notas, separa a las especies en dos grupos: (1) a los individuos del clado D con valores altos, y (2) a los individuos del clado C junto a la primera y segunda variación del canto perteneciente al clado F, con valores bajos (Fig. 22).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron marcadores moleculares para identificar el número de linajes a nivel de especies entre las poblaciones de *H. calcaratus* e *H. fasciatus* en la amazonía ecuatoriana, dando como resultado seis clados con buen soporte. Generalmente hubo correspondencia entre la variación genética, la variación en los cantos y la variación morfológica lo que confirma que cada uno de los seis clados representa una especie.

6.1. FILOGENIA Y LÍMITES ENTRE ESPECIES

Los análisis filogenéticos, indicarían que lo que actualmente se reconoce como *H. calcaratus* e *H. fasciatus* representaría un complejo de seis especies diferentes. Esta conclusión se deriva de la integración de información genética, comportamental y morfológica. A continuación, discuto las implicaciones taxonómicas de los resultados.

Tradicionalmente se ha discriminado entre *Hypsiboas calcaratus* e *Hypsiboas fasciatus* en base a caracteres morfológicos: se ha asignado el nombre de *H. calcaratus* a individuos con calcar prominente y barras transversales en los flancos y muslos. Así mismo, se ha denominado como *H. fasciatus* a los individuos que no presentan calcar, poseen manchas oscuras en los flancos y muslos y que tienen pequeñas motas cafés en el pecho y la región gular (Duellman, 1973).

El presente estudio evidenció dos grupos monofiléticos basales con caracteres morfológicos distintivos. Uno de los caracteres es el calcar que se encuentra presente en el clado que agrupa a los linajes A, B, C y D y está ausente en el clado que agrupa a E y F. Por otra parte, los puntos oscuros en los flancos y muslos y la presencia de motas marrones en el pecho y la región gular caracterizan a los clados E y F.

La examinación del holotipo de *H. fasciatus* (BM 58.4.25; Fig. 23) sugiere que

pertenece al clado A por la combinación de presencia de calcar y barras negras en los flancos y muslos. Esta asignación también es consistente con la localidad tipo “Andes del Ecuador” puesto que el clado A tiene un rango altitudinal de 700 a 1600 m. Aunque el clado B también está distribuido en los Andes (rango 800 a 1600 m) y posee calcar, se diferencia del holotipo por tener barras verticales de un menor grosor en los flancos y en las superficies no expuestas de los muslos. En cuanto a los análisis morfométricos del holotipo de *H. fasciatus*, la proyección del individuo sobre el CP1 y el CP2 (Fig. 13) no muestra correlación con el clado B, al contrario el holotipo se encuentra ubicado cerca de dos individuos pertenecientes al clado A lo cual sería consistente con la asignación del nombre *H. fasciatus* al clado A.

El holotipo de *H. calcaratus* no pudo ser examinado porque está perdido (Frost, 2010). La traducción al inglés de la descripción del holotipo de *H. calcaratus* presentada por Duellman (1973) y la ubicación de la localidad tipo sugieren que pertenece al clado C. El énfasis que Troschel (1848) en el tamaño del calcar sugeriría que se trata de la especie con calcar más grande, es decir el clado C (Fig. 10). Esta designación también está sustentada por la distribución geográfica del clado C puesto que es la única especie con calcar desarrollado y barras verticales en los flancos que está en tierras bajas (bajo 700 m de altitud), al igual que la localidad tipo de *H. calcaratus* (“British Guiana”).

Los análisis del material tipo de *Hyla leptoscelis* (Boulenger, 1918) y de *Hyla steinbachi* (Boulenger, 1905) los cuales están bajo la sinonimia de *H. calcaratus* e *H. fasciatus*, indican que no son conespecíficos con los clados B, D, E y F (S. Ron, com. pers.)

En resumen, de las seis especies identificadas, el clado A correspondería al *H. fasciatus* y el clado C a *H. calcaratus* y los clados B, D, E y F serían especies nuevas a

la espera de ser descritas. Los caracteres diagnósticos presentados por Duellman (1973) no permiten discriminar correctamente entre *H. fasciatus* y *H. calcaratus*. Duellman (1973) describe a *H. fasciatus* con un patrón de coloración de manchas oscuras en los flancos y muslos (sin barras), sin calcar y con motas en la región gular y el pecho (caracteres que son consistentes con los clados E y F). Los especímenes que Duellman (1973, 1978) asigna a *H. calcaratus* incluirían individuos de *H. calcaratus* sensu stricto (clado C), *H. fasciatus* (clado A) y una especie no descrita (clado B).

Los clados hermanos A y B tienen rangos altitudinales similares (700 m hasta 1600 m) pero al parecer se reemplazan latitudinalmente (clado A al sur, clado B al norte). Al parecer habría una zona de contacto en la localidad de Limón por lo que su distribución sería parapátrica (Fig. 4). Basándose en esto, se podría sugerir que las especies A y B se formaron por vicarianza; sin embargo no está claro cual podría haber sido la barrera. Ejemplos de este tipo de patrón de especiación latitudinal en los Andes han sido reportados por Guarnizo *et al.*, (2009) para el complejo de especies *Dendropsophus labialis* y por Graham *et al.*, (2004) para *Hyloxalus vertebralis* e *H. pulchellus*. Debido a que no se conoce con exactitud la distribución actual de los diferentes clados del complejo especies *H. calcaratus*-*H. fasciatus*, los cuales podrían tener un amplio rango de distribución, no se ha podido determinar con exactitud los modos de especiación involucrados.

Según Fouquet *et al.* (2007) los valores de las distancias genéticas mayores a un 3% para el gen 16S son lo suficientemente sustentables para aplicar el estatus de “especie candidata”; de acuerdo con esta información, se podría inferir que los clados obtenidos en el presente trabajo son nuevas especies puesto que las distancias no corregidas *p* para el gen 16S estuvieron en un rango de 0.035–0.049 (entre los clados A y B), 0.037–0.055 (para los clados B y C), 0.081–0.101 (entre el clado C y D) y 0.023–

0.037 para los clados E y F (Tabla 23).

Los clados E y F presentan una distancia génica p no corregida de 0.028 ± 0.002 , lo que indicaría que son linajes evolutivos muy recientes y cuyo tiempo de divergencia es menor al de los otros clados. Sin embargo, la marcada diferencia en sus cantos de anuncio y en el tamaño del tímpano indica que se trata de unidades evolutivas independientes. En el caso del clado F, solo se conoce una localidad (Comunidad Santa Rosa, Napo) por lo que su rango de distribución está pobremente entendido.

La filogenia realizada con el gen nuclear POMC (Fig. 3) no muestra los clados A, B y C. La falta de resolución sería producto de la baja tasa de evolución de este gen pues las distancias genéticas p entre los clados A–F para el gen POMC están en el rango <0.001 – 0.04 ; mientras que para los genes 12S y 16S el rango es <0.001 – 0.097 . Sin embargo, las únicas ramas que tienen una probabilidad posterior Bayesiana de 1.0 en la filogenia de POMC son congruentes con la filogenia basada en genes mitocondriales.

6.2. DIVERGENCIA MORFOLÓGICA

Las ranas pertenecientes a este complejo de especies se encuentran caracterizadas por una morfología relativamente conservada que puede ocultar una profunda diferenciación genética, lo que indica que la tasa molecular está divergiendo más rápidamente que la evolución morfológica (Heyer y Maxson, 1982; Duellman y Tueb, 1994).

Luego de separar a los especímenes en los correspondientes clados obtenidos en la filogenia de este estudio, y revisar caracteres taxonómicos para cada clado (Tabla 19); se pudo determinar que la estructura filogenética inferida es consistente con las diferencias morfológicas. Es así, que se pueden evidenciar patrones muy parecidos en clados que se encuentran cercanamente emparentados, como es el caso de los clados A

y B, lo cual sustenta la hipótesis de que comparten un ancestro común muy reciente y que su similitud se debe a la relación filogenética cercana. En otras palabras, la variación morfológica parece tener una fuerte señal filogenética.

También se han encontrado variables cualitativas únicas (autopomorfías) útiles para diferenciar a los nuevos linajes evolutivos. Entre ellas tenemos: una banda rojiza en el iris de los individuos del clado A; el grosor de las barras en los muslos del clado B; el patrón de coloración de barras transversales oscuras en los flancos que llega hasta las extremidades superiores para el clado C; el patrón de manchas en los flancos y muslos característicos del clado D; y la ausencia del calcar y la presencia de motas pequeñas en el cuello y pecho para los clados E y F.

En cuanto a los caracteres morfométricos, se ha encontrado que el tamaño (~2.00 mm) y la forma triangular del calcar en el clado C es un buen carácter para distinguirlo de los demás clados. Por otra parte, el diámetro de tímpano y la longitud del fémur son útiles para distinguir entre los clados E y F, los cuales presentan una morfología muy similar.

Los análisis morfométricos para los clados A, B, C y D son consistentes con las variables cualitativas; es decir, especies que pueden distinguirse en base a caracteres cualitativos se separan de las otras en base a caracteres morfométricos.

6.3. DIVERGENCIA EN CANTOS DE ANUNCIO

De acuerdo con los resultados obtenidos en los cantos de anuncio, cada clado tiene un llamado marcadamente diferente de los demás. La excepción esta dada por los cantos de los clados A y B que solo se diferencian en el tiempo de subida (Tabla 24). Estudios sistemáticos en varios géneros de anuros, han demostrado que especies que comparten atributos morfológicos también tiene cantos de anuncio estructuralmente

similares (Duellman y Trueb, 1994).

Al parecer existe una variedad de presiones selectivas que influyen en las vocalizaciones de los anuros (Rand, 1985). En particular, los cantos permiten a las hembras elegir sus parejas por lo que cumplen un rol muy importante en el aislamiento reproductivo (Gerhardt, 1994; Cocroft y Ryan, 1995). Por ello, los cantos son estereotipados para cada especie por lo que están entre los caracteres más útiles para definir límites de especies.

Además del efecto de las presiones selectivas, existe evidencia de cambios no adaptativos en la evolución de los cantos de anuncio que pueden atribuirse a procesos estocásticos como la deriva genética. Adicionalmente, los cantos pueden evolucionar por efectos pleiotrópicos relacionados con la evolución morfológica (Erdtmann y Amézquita, 2009). Todavía no está claro qué fuerza evolutiva es responsable de la elevada tasa de evolución de los cantos entre especies del complejo *H. calcaratus*-*H. fasciatus*. Sin embargo, las altas tasas de evolución son consistentes con el proceso de selección sexual pues a menudo se observa que los únicos caracteres fenotípicos que diferencian especies cercanamente relacionadas son aquellos bajo este tipo de selección.

Existe una amplia variedad en la composición estructural de las vocalizaciones analizadas, encontrándose que algunos clados presentan series de llamados con una sola nota (clado C y F), series de llamados de 3-4 notas (clado B y D) e incluso series de llamados que alcanzan las 5 notas (clado A y E). También está el clado que presenta una variedad muy particular de canto de anuncio, al cual se lo ha denominado “canto 2” (clado F).

Con respecto a la duración del llamado hay una gran variación entre los clados. Así se encuentran clados que presentan un canto extremadamente corto de 0.05 s (clado C) y otros cuya duración del canto podría llegar a ser de 0.90 s (clado A). Por otra parte,

la frecuencia dominante fue la variable con menor variación entre los 6 clados.

Adicionalmente, se ha encontrado que los clados cercanamente emparentados que están en localidades simpátricas, presentan una mayor divergencia del recurso acústico como resultado de un posible desplazamiento reproductivo de caracteres, mediante el cual estarían evitando la hibridación entre especies (Gerhard y Hubert, 2002). Entre las especies analizadas, hasta tres especies pueden encontrarse en simpatria (ej. los clados C, D y E en el Coca). En esas localidades los cantos son marcadamente diferentes entre sí, aunque no está claro si la diferenciación es mayor que en localidades alopátricas.

6.4. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

La determinación de las identidades biológicas del complejo de especies *Hypsiboas calcaratus*-*H. fasciatus* es muy importante en el área de la conservación, por lo que es necesario identificar el número real de especies dentro de este grupo para poder tomar medidas de conservación que sean efectivas.

H. calcaratus e *H. fasciatus* son consideradas como dos especies, con un amplio rango de distribución, y han sido clasificadas en la categoría de Preocupación Menor según la IUCN (2010). Es por eso que es importante redefinir el rango de distribución para estas dos especies y reevaluar su estatus de conservación, para que posteriormente se apliquen las medidas pertinentes. Además, en este trabajo se determinó la existencia de cuatro especies, que podrían ser endémicas del Ecuador, y cuyos rangos de distribución no se encuentran delimitados.

Finalmente, para obtener una visión más clara de la filogenia de este complejo de especies, se recomienda realizar análisis posteriores, ya sea incrementando el tamaño de las muestras o incluyendo individuos pertenecientes a otros países que formen parte

de este complejo de especies. De esta manera, podremos lograr un mejor entendimiento de las relaciones evolutivas y estimar el impacto potencial del sistema molecular en el descubrimiento de nuevas especies en los trópicos (Ron *et al.*, 2006).

7. LITERATURA CITADA

- Angulo, A. 2002. Anfibios y paradojas: Perspectivas sobre la diversidad y las poblaciones de anfibios. *Ecología Aplicada* 1: 105–109.
- Bernal, M. H., Montealegre, D. P., Páez, C. A. 2004. Estudio de la vocalización de trece especies de anuros del municipio de Ibagué, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana Ciencias* 108: 385–390.
- Cocroft, R., Ryan, M. J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behavior* 49: 283–303.
- Coloma, L. A (ed). 2005–2010. Anfibios de Ecuador. [en línea]. Ver. 2.0 (29 Octubre 2005). Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/anfibiosecuador/index.html>>[Consulta: 29 Julio 2010].
- Cornell Lab of Ornithology. 2003–2008. Raven pro. Versión 1.3. Bioacoustic Research Program. New York, United States of America.
- Darst, C. R., y Cannatella, D. C., 2004. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 31: 462–475.

- Duellman, W. E. 1973. Frogs of the *Hyla geographica* Group. American Society of Ichthyologists and Herpetologists 3: 515–533.
- Duellman, W. E. 1978. The biology of an Equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. University of Kansas, Natural History Museum. Miscellaneous Publications 65: 1–352.
- Duellman, W. E. y Tueb, L. 1994. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins University Press. United States of America.
- Duellman, W. E. 2001. The Hylid Frogs of Middle America. Volume 1. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, New York.
- Duellman, W. E. 2005. Cusco Amazónico, the lives of amphibian and reptiles in an Amazonian rainforest. Ithaca: Cornell University Press.
- Erdtmann, L. y Amézquita, A. 2009. Differential evolution of advertisement call traits in dart-poison frogs (Anura: Dendrobatidae). Ethology 115: 801–811.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., García, P., Frost, D., Campbell, J. A., 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, New York.

- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. y Gemmell, N.J. 2007 Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. Public Library of Science Biology One 2: e1109.
- Frost, D. R. 1998–2010. Amphibian Species of the World: an Online Reference v. 5.4. New York: American Museum of Natural History.
- Gene Codes Corporation, 2000. Sequencer Version 4.1. Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI.
- Gerhardt, H. C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. Annual Review of Ecology and Systematics 25: 293–324.
- Gerhardt, H. C. y Huber, F. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anuras: common problems and diverse solutions. The University of Chicago Press, Ltd., London.
- Goebel, A. M., Donnelly, J. M. y Atz, M. 1999. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome *b* in Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. Molecular Phylogenetic and Evolution 11: 163–199.

- 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.
- Graybeal, A., 1997. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and test of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zoological Journal of the Linnean Society* 119: 297–338.
- Guarnizo, C. E., Amézquita, A., Birmingham, E. 2009. The relative roles of vicariance versus elevational gradients in the genetic differentiation of the high Andean tree frog, *Dendropsophus labialis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 84–92.
- Heyer, W. R., Maxson, L. R. 1982. Neotropical frog biogeography: paradigms and problems. *American Zoologist* 22: 397–410.
- Huelsenbeck, J. P. y Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics* 17: 754–755.
- IUCN 2010. Red List of Threatened Species. Version 2010.1 <www.iucnredlist.org>. [Consulta: 24 Julio 2010].
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, y Higgins, D. 2007. Clustal W and Clustal X versión 2.0 *Bioinformatics* 23: 2947–2948.

- Maddison, D. R. y Maddison, W. P. 2000. MacClade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution. Vers. 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, United States of America.
- McLister, J. D., Stevens, E.D., Bogart, J. P. 1995. Comparative contractile dynamic of calling and locomotor muscles in three Hylid Frogs. *The Journal of Experimental Biology* 198: 1527–1538.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. Privately published document compiled by S. Palumbi, Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.
- Pauly, G. B., Hillis, D. M., Cannatella, D. C. 2004. The History of a Nearctic Colonization: Molecular Phylogenetics and Biogeography of the Neactic Toads (*Bufo*). *Evolution* 58: 2517–2535.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 12535–1256.
- Rand, A. S. 1985. Tradeoffs in the evolution of frogs calls. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Animal Science)* 6: 623–637.
- Read, M. 2000. Frogs of the Ecuadorian Amazon. A guide to their calls. Morley Read Productions. Disco Compacto.

- Ron, S. R., Santos, J. C., Cannatella, D. C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 39:392–403.
- SPSS, Inc. 2009. SPSS for Windows, release 17.0. SPSS Inc., Chicago, United States of America.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), versión 4.0. Sunderland, Massachusetts, United States of America.
- Wiens, J. J., Fetzner, J. W., Parkinson, C. L., Reeder, T. D. 2005. Hylid Frog Phylogeny and Sampling Strategies for Speciose Clades. *Systems Biology* 54: 719–748.