

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

Sistemática y filogeografía de *Hypsiboas pellucens* (Werner, 1901) e *Hypsiboas rubracylus* (Cochran and Goin, 1970) (Anura: Hylidae)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en ciencias biológicas

FRANCY GABRIELA MORA BOLAÑOS

Quito, 2013

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Francy Gabriela Mora Bolaños 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
Mayo del 2013

A mis abuelos por darme su
cariño, confianza incondicional
y ser mi gran ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Santiago R. Ron, director de la disertación, por su paciencia, apoyo, guía y disponibilidad permanente y a la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Investigación (SENACYT) por el financiamiento del proyecto código PIC 08–0470 “Inventario y caracterización genética y morfológica de la diversidad de reptiles, aves y anfibios de los Andes del Ecuador”.

A Pablo Menéndez, Marcel Caminer, Ana Troya, Omar Torres, Luis Coloma, Ítalo Tápia, Paloma Lima, Eduardo Toral, Ana Almendariz, Mario Yáñez, Santiago Burneo y Morley Read por su paciencia, sugerencias y enseñanzas que fueron un gran aporte en la elaboración de este trabajo.

A mis padres y hermanos, David y Nicole, que día a día me dieron su apoyo y cariño incondicional. A mis amigos, Diego Páez, Daniel Chávez, Dany Pareja, Diana Troya, Pauli Romero, Edwin Carrillo, Augusto Sola, Mabe Cabezas, Luz Llangarí, Lucas Bustamante, Daniel Zurita, Leonardo Negrete, por su amistad, apoyo y consejos que han sido una gran ayuda y fuente de fortaleza en mi vida personal. A Teresa Camacho, Andrés Merino, Pablo Sanchez, Paulina Santiana, Damian Nicolalde, Vanesa Aguirre y Amaranta Carvajal por sus consejos, que han sido de mucha utilidad en la elaboración de este trabajo.

Finalmente quedo agradecida al Ministerio de Ambiente por los permisos de colección otorgados para el año 2012, al Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y a Pablo Venegas del Centro de Orintología y Biodiversidad del Perú (CORBIDI) por su colaboración con tejidos de *H. rubracylus*.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. HISTORIA TAXONÓMICA.....	6
3.1.1. <i>Hypsiboas pellucens</i>	6
3.1.2. <i>Hypsiboas rubracylus</i>	6
3.2. ANTECEDENTES	7
3.3. OBJETIVOS.....	8
3.3.1. OBJETIVO GENERAL	8
3.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN	10
4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	10
4.2.1. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	11
4.2.2. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA	12
4.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	13
4.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	13
4.4. ANÁLISIS DE LOS CANTOS DE ANUNCIO	14
4.5. ANÁLISIS DE ENVOLTURA AMBIENTAL Y MODELAMIENTO DE NICHOS...	15
4.5.1. ENVOLTURA AMBIENTAL.....	15
4.5.2. MODELAMIENTO DE NICHOS ECOLÓGICO	16

4.6. CORRELACIÓN ENTRE DISTANCIAS GENÉTICAS Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS	18
4.7. DETERMINACIÓN DE ESPECIES.....	18
5. RESULTADOS	20
5.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS	20
5.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS	21
5.2.1. VARIABLES MORFOMÉTRICAS	21
5.2.2. VARIABLES CUALITATIVAS	24
5.3. CANTOS DE ANUNCIO.....	25
5.3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CANTOS PARA CADA CLADO.....	25
5.4. ENVOLTURA AMBIENTAL	28
5.5. MODELAMIENTO DE NICHOS	28
5.6. CORRELACIÓN ENTRE DISTANCIAS GENÉTICAS Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS.....	31
6. DISCUSIÓN.....	32
6.1. DIVERGENCIA MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA.....	32
6.2. DIVERGENCIA EN CANTOS DE ANUNCIO.....	33
6.3. ENVOLTURA AMBIENTAL Y MODELAMIENTO DE NICHOS.....	34
6.4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	36
7. LITERATURA CITADA.....	38
8. FIGURAS	47
9. TABLAS.....	76
10. ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de los individuos secuenciados en este estudio.....	48
Figura 2. Filograma del análisis bayesiano de los genes combinados 12S, 16S, ND1 y POMC	49
Figura 3. Filograma del análisis de inferencias bayesianas del fragmento del gen POMC ..	50
Figura 4. Filograma del análisis de máxima verosimilitud del fragmento del gen 12S.....	51
Figura 5. Filograma del análisis de máxima verosimilitud del fragmento del gen 16S.....	52
Figura 6. Filograma del análisis de máxima verosimilitud del fragmento del gen ND1	53
Figura 7. Diagrama de caja de la longitud rostro cloacal (LRC) de los machos adultos vs. hembras adultas de <i>Hypsiboas pellucens</i>	54
Figura 8. Proyección de las variables morfométricas de machos adultos de <i>Hypsiboas pellucens</i> sobre los componentes principales	55
Figura 9. Proyección de las variables morfométricas de hembras adultas de <i>Hypsiboas pellucens</i> sobre los componentes principales	56
Figura 10. . Diagrama de caja del tamaño del calcar (TC) de los machos adultos del complejo de especies <i>Hypsiboas pellucens</i>	57
Figura 11. Regresión lineal entre la variable longitud rostro cloacal (LCR) y el tamaño del calcar (TC) para los clados A, B y C pertenecientes a <i>Hypsiboas pellucens</i> (machos).....	58
Figura 12. Vista dorso lateral y ventral de machos adultos	59
Figura 13. Cantos de anuncio pertenecientes a la localidad de Durango-Esmeraldas.....	60
Figura 14. Cantos de anuncio pertenecientes a la localidad de Los Bancos-Pichincha.....	61
Figura 15. Cantos de anuncio pertenecientes a la localidad de Puyango-Loja	62
Figura 16. Proyección de las variables acústicas sobre los componentes principales	63

Figura 17. Proyección de las variables climáticas Temperatura Media Anual y Precipitación Anual de individuos secuenciados de <i>Hypsiboas pellucens</i>	64
Figura 18. Proyección de las variables climáticas de individuos secuenciados de <i>Hypsiboas pellucens</i> sobre los componentes principales	65
Figura 19. Modelo predictivo de nicho ecológico para los tres clados en base a condiciones actuales	66
Figura 20. Modelo predictivo de nicho ecológico para los tres clados en base a condiciones pasadas	67
Figura 21. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado A en base a condiciones actuales	68
Figura 22. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado A en base a condiciones pasadas	69
Figura 23. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado B en base a condiciones actuales.....	70
Figura 24. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado B en base a condiciones pasadas	71
Figura 25. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado C en base a condiciones actuales	72
Figura 26. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado C en base a condiciones pasadas	73
Figura 27. Mapa de estabilidad ambiental entre pasado y presente para los tres clados	74
Figura 28. Cuadro de dispersión de distancias geográficas vs. distancias genéticas.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fragmentos secuenciados por cada individuo colectado	77
Tabla 2. Descripción de las variables morfométricas basada en Duellman (2001).	79
Tabla 3. Descripción de las variables temporales y espectrales obtenidas del análisis de los cantos de anuncio de <i>Hypsiboas pellucens</i>	80
Tabla 4. Modelos de evolución seleccionados para cada partición en los análisis filogenéticos con el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008).	81
Tabla 5. Distancias genéticas p no corregidas del gen 12S entre los 3 clados y el grupo externo.	82
Tabla 6. Medidas obtenidas de machos adultos de <i>Hypsiboas pellucens</i>	83
Tabla 7. Medidas obtenidas de hembras adultas de <i>Hypsiboas pellucens</i>	84
Tabla 8. Resultados del análisis de la prueba de t comparando la variable longitud rostro cloacal (LRC) entre clados para machos y hembras.	85
Tabla 9. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable morfométrica en machos pertenecientes a <i>Hypsiboas pellucens</i>	86
Tabla 10. Resultados del análisis de la prueba de t comparando dos componentes principales entre clados (machos).	87
Tabla 11. Resultados del análisis de la prueba de t con la variable ancho de la cabeza (AC) y largo de la cabeza (LC) entre los diferentes clados (machos).	88
Tabla 12. Resultados del análisis de la prueba de t con la variable longitud de la tibia (LTI) y longitud del fémur (LFE) entre los diferentes clados (machos)	89

Tabla 13. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable morfométrica en hembras pertenecientes a <i>Hypsiboas pellucens</i>	90
Tabla 14. Resultados del análisis de la prueba de <i>t</i> comparando dos componentes principales entre clados (hembras).....	91
Tabla 15. Resultados del análisis de la prueba de <i>t</i> con la variable longitud de la tibia (LTI) y largo de la cabeza (LC) entre los diferentes clados (hembras).....	92
Tabla 16. Resultados del análisis de la prueba de <i>t</i> con la variable diámetro del tímpano (DT) (hembras).....	93
Tabla 17. Medias de variables bioacústicas para el primer tipo de canto para los tres clados.	94
Tabla 18. . Medias de variables para la primera y segunda nota del segundo tipo de canto para los tres clados.....	95
Tabla 19. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable bioacústica.	97
Tabla 20. Resultados del análisis de la prueba de <i>t</i> comparando dos variables ambientales, Temperatura Media Anual (BIO1) y Precipitación Anual (BIO12).	98
Tabla 21. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable ambiental en individuos secuenciados pertenecientes a <i>Hypsiboas pellucens</i>	99
Tabla 22. Resultados del análisis de la prueba de <i>t</i> comparando dos componentes principales de las variables ambientales entre clados.....	100

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guanadina	102
Anexo 2. Regiones de ADN y cebadores utilizados en este estudio	104
Anexo 3. Protocolos para amplificar los genes mitocondriales y nucleares utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	105
Anexo 4. Prueba estadística Kolmogorov-Smirnov para el análisis de la normalidad de las variables.	106
Anexo 5. Lista de individuos del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador incluidos en este estudio.	107
Anexo 6. Capas climáticas no correlacionadas usadas para el modelamiento de nicho	113
Anexo 7. Estimaciones de las contribuciones relativas de las variables ambientales en el primer modelo (Clado A) de Maxent	114
Anexo 8. Estimaciones de las contribuciones relativas de las variables ambientales en el primer modelo (Clado B) de Maxent	115
Anexo 9. Estimaciones de las contribuciones relativas de las variables ambientales en el primer modelo (Clado C) de Maxent	116

1. RESUMEN

Debido a su amplia variación morfológica y distribución se sospecha que *Hypsiboas pellucens* es un complejo de especies. En el presente estudio se realizó un análisis integrativo en el cual se incluyó caracteres moleculares, morfológicos y ecológicos para explorar la presencia de linajes crípticos en esta especie.

Para determinar la variación genética se muestrearon alrededor de 3822 pb de ADN de genes mitocondriales (12S, 16S, ND1) y un gen nuclear (POMC) de 42 individuos de *H. pellucens* y dos individuos de *H. rubracylus*, una especie cercanamente relacionada. Con la finalidad de analizar patrones morfológicos se revisó la coloración del dorso, vientre, flancos y superficies no expuestas de los muslos, iris y membranas interdigitales. Además, se analizaron ocho variables morfométricas. Por otra parte, para determinar si existe diferenciación ecológica entre los clados, se realizó un análisis de la envoltura ambiental y una predicción de la distribución del hábitat idóneo de los clados mediante modelos de nicho ecológico al presente y también bajo condiciones del último glacial máximo. Se determinó que *H. pellucens* está conformado por tres clados con alto soporte. Los clados parecen ser alopátricos y los resultados del modelamiento de nicho muestran diferencias ambientales entre clados, principalmente de temperatura media anual y precipitación media anual. El clado A se distribuye al norte de la provincia de Esmeraldas, en el Bosque Húmedo Tropical del Chocó. El área se caracteriza por una alta temperatura y precipitación. El rango geográfico del clado B tiene temperaturas más bajas y alta precipitación. Se distribuye desde el sur de Esmeraldas hasta Los Ríos, en Bosque Piemontano Occidental, Bosque Húmedo Tropical del Chocó y Bosque Deciduo de la costa. El rango geográfico del clado C tiene temperaturas altas con baja

precipitación y se distribuye desde la provincia de Guayas al norte hasta la Provincia de Loja y el Departamento de Tumbes (Perú) al sur. Habita en Bosque Deciduo de la Costa, Bosque Piemontano Occidental y Matorral Seco de la Costa. Pruebas de Mantel demostraron que dentro del clado B hay una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, mientras que dentro de A y C la correlación está ausente. Una comparación de las condiciones presentes y pasadas sugiere más estabilidad ambiental dentro del rango del clado B lo cual podría explicar que sea el clado con mayor diversidad genética. La divergencia genética y la diferenciación ecológica indican que *H. pellucens* es un complejo de especies que incluye a *Hypsiboas pellucens* sensu stricto, una especie candidata confirmada y una especie candidata no confirmada.

Palabras claves: análisis integrativo, complejo de especies, especies crípticas, filogenia, modelamiento de nicho, variables climáticas.

2. ABSTRACT

Due to its large morphological variation and its distribution it is suspected that *Hypsiboas pellucens* is a species complex. In the present study I carried out an integrative analysis which included molecular, morphological and ecological characters to explore the presence of cryptic lineages in this species.

To assess the genetic variation, approximately 3822 bp of mitochondrial genes (12S, 16S and ND1) and one nuclear gene (POMC) were sampled in 42 individuals of *H. pellucens* and two individuals of *H. rubracylus*, a closely related species. To analyze morphological patterns, the coloration of the dorsum, abdomen, flanks and non-exposed surfaces of the muscles, iris and interdigital membranes were studied. In addition, eight morphometric variables were analyzed. To determine if ecological differentiation exists between clades, an analysis of environmental envelope and environmental niche modeling of genetic groups were carried out under current and last glacial maximum conditions. *Hypsiboas pellucens* is formed by three well supported clades. The clades seem to be allopatric and the results from the niche modeling analysis show environmental differences between clades, mainly in annual average temperature and annual average precipitation. Clade A is distributed at the North of Esmeraldas province, in the Choco Tropical Rainforest. The area is characterized by a high temperature and precipitation. The geographical range of Clade B has lower temperatures and high precipitation. It is distributed from the south of Esmeraldas Province to Los Ríos Province in Western Montane Forest, Choco Tropical Rainforest and Coastal Deciduous Forest. The geographical range of Clade C has high temperature and low precipitation and is distributed from Guayas Province to the North, to Loja Province and Departamento de Tumbes (Peru) to the South. Clade C inhabits Coastal Deciduous Forest, Western Montane

Forest and the Dry Coastal Scrubland. Mantel tests showed that within Clade B and C there is a correlation between genetic distance and geographic distance, while within Clades A the correlation is not significant. A comparison between past and present conditions suggests more environmental stability in the range of clade B, which can explain the high genetic diversity within this clade. The genetic divergence and ecological differences suggest that *H. pellucens* is a species complex that consist of *Hypsiboas pellucens sensu stricto* and one confirmed and one unconfirmed candidate species.

Key words: cryptic species, integrative analysis, niche modeling, phylogeny, species complex, weather variables.

3. INTRODUCCIÓN

Los anfibios ecuatorianos representan el 9% de la diversidad mundial. No obstante, la cifra actual de 531 especies descritas formalmente (Ron *et al.* 2013) dista de ser real, pues se presume la existencia de no menos de 700 especies (Coloma *et al.* 2007; Ron *et al.* 2006). Muchas de las especies sin describir son morfológicamente crípticas por lo que solamente podrán ser identificadas en base a caracteres genéticos y/o bioacústicos (Bickford *et al.* 2006).

Aunque hay varias definiciones de especie críptica, en este trabajo se considerará que son especies cercanamente relacionadas que han divergido recientemente y que son morfológicamente indistinguibles (Bickford *et al.* 2006).

La diversidad críptica se produce porque la especiación no siempre va acompañada de cambios morfológicos (Bickford *et al.* 2006). Estudios anteriores muestran que especies de anfibios con una amplia distribución con frecuencia esconden especies crípticas. Un ejemplo de esto son las especies del complejo *Hypsiboas fasciatus-Hypsiboas calcaratus*; este complejo se distribuye en las Guayanas, en el norte y centro de la cuenca Amazónica, y hacia la región oriental de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. Estudios recientes indican que lo que actualmente se reconoce como *H. calcaratus* e *H. fasciatus* representa un complejo de seis a nueve especies diferentes. Esta conclusión se deriva de la integración de información genética, comportamental y morfológica (Funk *et al.* 2011).

Otra especie de *Hypsiboas* con amplia distribución es *Hypsiboas pellucens*. Habita en la región del Chocó Neotropical incluyendo la zona del Pacífico desde el oeste de Colombia (Playa de Oro, departamento de Chocó) hasta el noroeste de Perú (provincia de Zarumilla, Departamento de Tumbes) a elevaciones entre los 100 y 1000 msnm (Duellman 1971; Venegas *et al.* 2008).

3.1. HISTORIA TAXONÓMICA

Estudios realizados por Duellman (1971) y Faivovich *et al.* (2005) incluyen a *H. pellucens*, como parte del complejo *Hyla albomarginata*, reconocido por primera vez por Cochran (1955), junto con *H. rufitela* y *H. albomarginata*, en los cuales la única posible sinapomorfía es la coloración roja de los flancos. Este grupo se diferencia de los complejos *H. albofrenata* y *H. albosignata*, por la presencia de una espina prepólica.

3.1.1. *Hypsiboas pellucens*

Hypsiboas pellucens fue descrita por Werner en 1901. La localidad tipo es “Palmar a 100 msnm al oeste de los Andes” (= Palmar), en el Río Chila, Provincia de Manabí, Ecuador (Duellman, 1971). Según la descripción de Werner (1901), el holotipo tiene la cabeza más ancha que larga; el cantus es oblicuo y poco profundo; el hocico es redondeado, con el borde recto y romo; el tímpano es claro y es la mitad del ancho del diámetro del ojo; presenta discos digitales palmeados y una clara y rudimentaria espina prepólica; la articulación tibio-tarsal llega justo a la zona entre las fosas nasales y los ojos; la parte dorsal es lisa; la zona ventral es granulada, de color blanco lechoso y no pigmentado; las extremidades, en su zona ventral, son translúcidas y no pigmentadas; no presenta pliegues en los talones; solo presenta puntos oscuros (negros-cafés) como “marcas de pulgas” en la cabeza, dorso y extremidades anteriores y posteriores, aun cuando en la cabeza y dorso hay una mayor acumulación de estos puntos.

3.1.2. *Hypsiboas rubracylus*

Hypsiboas pellucens parece estar cercanamente relacionada con *H. rubracylus*, especie descrita por Cochran y Goin en 1970. La localidad tipo es Río Calima, cerca a Córdoba, Departamento Valle, Colombia. Cochran y Goin (1970) la agruparon junto con *H.*

cinerascens, sin tomar en cuenta las similitudes con el grupo de *H. albomarginata* (Duellman, 1971). Según Duellman (1971), el holotipo de esta especie es morfológicamente similar a *H. pellucens* de Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador por lo que la considera un sinónimo junior de *H. pellucens*.

Sin embargo, en febrero de 1971, Charles W. Myers encontró individuos de ambas especies de *Hypsiboas* en un bosque pantanoso, a 2 km sobre la Playa del Oro, cuenca alta del Río San Juan, Chocó, Colombia. En base a esos especímenes Duellman (1974) resucita a *H. rubracylus*. El primer reporte de *H. rubracylus* en Ecuador corresponde a Yáñez-Muñoz *et al.* (2009), aquí se describe a esta especie como nocturna y arbustiva, asociada a pozas de agua estancada dentro de bosques maduros. Su patrón de coloración es verde claro con líneas cantales sobre los ojos y el dorso, con puntos rojos, y una característica distintiva de esta especie, que la diferencia del resto de hílidos del noroccidente ecuatoriano, es la ausencia de calcar. Se distribuye desde los Bosques Tropicales de la Vertiente Pacífico de Colombia hasta el noroccidente de Ecuador (Yáñez-Muñoz *et al.* 2009).

3.2. ANTECEDENTES

Para resolver el problema taxonómico en grupos de anuros, se han realizado varios estudios y se ha llegado a un consenso para construir una taxonomía integrativa, para definir una nueva especie, tomando en cuenta la divergencia de varios caracteres taxonómicos independientes (Jansen *et al.* 2011; Padial *et al.* 2010).

Otro método importante que enfatiza los aspectos históricos de la distribución de las especies es la filogeografía, este método busca las coincidencias geográficas entre especies en la distribución de linajes dentro de cada especie (Taberlet *et al.*, 1998) y la mejor forma de

explicar esta distribución y su rango geográfico es mediante la teoría de nicho ecológico. Esta teoría plantea que, en un determinado momento, todas las especies se ven limitadas por uno más factores bióticos o abióticos (Lomolino *et al.*, 2006). Es importante resaltar que los modelos de distribución de especies no pueden predecir la distribución actual ni potencial en su totalidad. El modelo puede identificar áreas alrededor de los puntos de ocupación que se espera sean ocupados, los puntos de distribución actual desconocidos y/o puntos de distribución potencial no ocupados aún (Pearson, 2007).

Por otra parte, estudios recientes han empleado modelos paleoclimáticos de las especies y los hábitats, en base a modelos de nicho ecológico, para proporcionar información sobre los procesos de diversificación genética y de especies. Este método predice áreas de estabilidad (refugios) y áreas inestables (colonización reciente). Debido a que los mapas de estabilidad plantean hipótesis específicas sobre diferencias regionales, conducen a predicciones filogeográficas (Carnaval *et al.*, 2009).

Ya que la mayor parte de conclusiones taxonómicas establecidas en base a un enfoque integrativo son relevantes, para observar si existe algún tipo de covariancia entre los caracteres taxonómicos y así determinar si *H. pellucens* esconde nuevas especies, en el presente trabajo, se realizó un análisis integrativo a partir del análisis genético, de los resultados morfológicos, de los resultados bioacústicos y distribución geográfica.

3.3. OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si *Hypsiboas pellucens* contiene especies morfológicamente crípticas.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la distribución geográfica de la variación genética en *Hypsiboas pellucens*.
- Determinar las diferencias de las posibles especies candidatas analizando su variación molecular, morfológica y bioacústica.
- Determinar posibles barreras geográficas que han influido en la diferenciación genética de *Hypsiboas pellucens*.
- Determinar si hay una correspondencia entre el nicho climático y los grupos genéticos de *Hypsiboas pellucens*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN

El ADN fue extraído de muestras de tejidos (hígado y músculo) de individuos colectados en el campo, tejidos disponibles en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) y en la colección del Centro de Ornitología y Biodiversidad del Perú (CORBIDI). Los tejidos fueron preservados en etanol al 95% y almacenados en ultracongeladoras a -80°C antes de los análisis. Se empleó el protocolo de M. Fujita (no publicado) con modificaciones del personal de Biología Molecular de herpetología (Anexo 1).

Después de extraer el ADN, se amplificó fragmentos totales o parciales de los genes mitocondriales 12S, 16S, ND1, tRNA^{Leu} y tRNA^{Ile} y porciones del gen nuclear de la proopiomelanocortina (POMC) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizaron los siguientes primers: t-Phe-frog y t-Val-frog, para 12S; 16SC1, 16Sbr-H y 12Sm y 16Sa para 16S; POMC-1, POMC-2, POMC-3 y POMC-4 para POMC; y 16S-frog y tMet-frog para ND1 (Palumbi *et al.* 1991; Pauly, 2004; Wiens *et al.* 2005) (Anexo2). El protocolo usado para el PCR se encuentra descrito en la Anexo 3. Una vez amplificados los fragmentos, fueron enviados a un laboratorio comercial para su secuenciación (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

4.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Para el análisis filogenético se utilizaron secuencias de 42 individuos de *H. pellucens* y dos *H. rubracylus* (Tabla 1). Además, se incluyeron cuatro muestras como grupo externo, dos

individuos de *H. calcaratus*, uno de *H. lanciformis* y uno de *Hypsiboas* aff. *fasciatus*, debido a que son especies cercanamente relacionadas (Faivovich, 2005).

Para cada individuo, las secuencias generadas (*forward* y *reverse*) fueron ensambladas para generar una secuencia consenso de las dos cadenas utilizando el programa Geneious Pro 5.3.4 (Drummond *et al.*, 2010). Las secuencias consenso fueron alineadas en Geneious con la extensión MAFFT Multiple Alignment (Kato *et al.*, 2002) para luego ajustar la alineación manualmente en el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2010).

Los análisis filogenéticos fueron generados usando los criterios de optimalidad de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana.

4.2.1. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

Este método tiene la ventaja de usar un criterio estadístico ya que considera la probabilidad de que los datos observados (secuencias de ADN) hayan sido producto de un árbol bajo un modelo evolutivo específico (Lemey *et al.* 2009). En principio, cada árbol posible implica diferentes probabilidades para varias configuraciones particulares de datos como las diferentes topologías, largo de ramas, parámetros del modelo evolutivo, etc. Al final se obtiene un árbol que maximice la probabilidad de obtener los datos observados.

Ya que cada gen presenta un mecanismo de evolución diferente se dividió a las secuencias en nueve particiones: (1) gen 12S, (2) gen 16S, (3) primera posición para los codones de ND1, (4) segunda posición para los codones de ND1, (5) tercera posición para los codones de ND1, (6) tRNA^{Leu} y tRNA^{Ile}, (7) primera posición para los codones de POMC, (8) segunda posición para los codones de POMC, (9) tercera posición para los codones de POMC.

Los análisis de máxima verosimilitud se hicieron con el programa Garli 2.0 (Zwickl,

2006). Para escoger el modelo de evolución de ADN más adecuado para cada gen y para las matrices combinadas, se utilizó el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) bajo el criterio de información Akaike (AIC) (Guindon y Gascuel, 2003) que realiza varias pruebas estadísticas con el fin de determinar cuál es el mejor modelo evolutivo que debe ser empleado. Para estimar los parámetros más adecuados se usó el método de bootstrap no paramétrico (BS) haciendo una búsqueda con 100 pseudoréplicas que calcularon los valores de apoyo para los nodos. Adicionalmente, se realizaron 10 corridas independientes para escoger el mejor árbol.

4.2.2. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA

Este criterio de optimalidad difiere del criterio de máxima verosimilitud en que no busca el mejor árbol sino una distribución probable de varios árboles (Lemey *et al.* 2009).

Se utilizaron dos estrategias de partición que generan modelos de evolución más complejos de las secuencias de ADN, permitiendo establecer distintas tasas de sustitución de los nucleótidos (Brandley *et al.*, 2005). Las estrategias de partición generadas son: Sin particiones, es decir, considerando los cuatro genes como un solo fragmento y con cinco particiones: (1) gen 12S, (2) gen 16S, (3) gen ND1, (4) gen POMC y (5) tRNA^{Leu} y tRNA^{Ile} de los extremos del gen ND1.

Para este análisis se utilizó el programa MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se utilizó el criterio de información Akaike (AIC) del programa JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) para obtener los modelos de evolución más acordes con los datos.

Cada análisis consistió en dos búsquedas independientes utilizando el algoritmo de la cadena Markov de Monte Carlo con cuatro cadenas por búsqueda por 30'000000 de generaciones. Se utilizó el programa TRACER v1.3 (Rambaut y Drummond, 2007) para monitorear los valores de verosimilitud, la convergencia de las búsquedas y el tamaño efectivo

de la muestra ($ESS > 200$) y confirmar que han alcanzado una asíntota. Se descartaron las primeras 15'000000 (50%) de generaciones (burn in) debido a que suelen tener probabilidades muy bajas.

Los resultados de las diferentes estrategias de partición fueron evaluados usando el Factor Bayesiano, el cual es el radio de la verosimilitud marginal y ésta se obtiene calculando las medias armónicas de las probabilidades posteriores obtenidas mediante los análisis de la cadena Markov Monte Carlo (Castañeda y de Queiroz, 2011; Torres-Carvajal y de Queiroz, 2009). Estos factores permiten escoger la mejor estrategia de partición de los caracteres. Para estimar los factores Bayes se usó el programa Tracer v1.3 (Rambaut y Drummond, 2007; Suchard *et al.*, 2001). Valores > 10 fueron considerados como un indicador de un fuerte soporte para la estrategia de más particiones sobre la estrategia de menos particiones (Castañeda y de Queiroz, 2011).

4.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

4.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Se aplicó la metodología de medición de Duellman (2001). Se revisó un total de 183 individuos adultos (159 machos y 26 hembras) de la colección del Museo de Zoología (QCAZ); con la ayuda de un calibrador digital, con precisión de 0.01mm marca Tresna, se tomó para cada individuo nueve medidas con una repetición de tres veces para obtener la media y reducir cualquier error de medición. Las variables medidas se listan en la Tabla 2.

Los valores obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Componentes Principales (ACP). Cada variable fue transformada a logaritmo en base 10 para normalizarla. Luego se obtuvieron los residuos de la regresión lineal entre cada variable y LRC. Posteriormente se

realizó una prueba de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov a los residuos con el fin de establecer que cumplan con los supuestos para ACP (Anexo 4). A partir de esto se realizó una prueba *t* de Student y un Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA) para determinar si existen diferencias entre sexos y localidades. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa SPSS ® (2009, Versión 17.0 para Windows).

Además se evaluaron los patrones de coloración de individuos vivos (en base a fotografías) y en preservación. Se examinó la coloración del dorso, vientre, flancos y superficies no expuestas de los muslos, iris y membranas interdigitales. Se tomaron en cuenta solamente los individuos 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.

4.4. ANÁLISIS DE LOS CANTOS DE ANUNCIO

Para la grabación de los cantos se utilizó una grabadora Olympus LS10 y un micrófono Sennheiser k6-ME67 unidireccional. En las grabaciones se colocó el micrófono a 0.5 a 1.5 m del animal. Los especímenes voucher (cuando fue posible capturarlos) fueron depositados en el museo QCAZ y los cantos están disponibles en el portal AmphibiaWebEcuador.

Los cantos se digitalizaron a una tasa de muestreo de 44,1 KHz y una resolución de 16 bit. El espectograma fue generado mediante una transformación Fourier Directa (DFT) a partir de una muestra de 4096 puntos y una resolución de frecuencia de 10.8Hz. En la Tabla 3 se listan los caracteres cuantificados. Las variables fueron medidas en el programa Raven Pro, versión 1.2.1 (Cornell Lab of Ornithology, 2008).

Pese al poco número de grabaciones (1 para el clado A, 6 para el clado B y 3 para el

clado C), se realizó un Análisis de Componentes Principales con las variables bioacústicas para ver si los clados se separan de alguna manera.

4.5 ANÁLISIS DE ENVOLTURA AMBIENTAL Y MODELAMIENTO DE NICHOS

4.5.1 ENVOLTURA AMBIENTAL

En base a las localidades georeferenciadas y mapas digitales de clima del Ecuador (Modelo bioclimático MAE 2011) se obtuvieron los valores climáticos de las localidades conocidas y secuenciadas de *H. pellucens* en Ecuador. Se compararon los grupos genéticos entre sí utilizando análisis de componentes principales (ACP), pruebas de *t* y MANOVAS para determinar si hay covariación entre los marcadores genéticos y el clima en las localidades de ocurrencia de *H. pellucens*.

La estrategia más común para estimar la distribución geográfica real o potencial de una especie es caracterizar las condiciones ambientales que son adecuadas para la especie e identificar donde se distribuyen (Pearson 2007). Una herramienta usada para este proceso predictivo de distribución es el modelamiento de nicho ecológico (MNE), que se basa en información de las condiciones ambientales y en los registros de sitios de ocurrencia conocidos (Pearson, 2007; Phillips, 2004). Estos dos tipos de datos se introducen en un algoritmo que tiene por objeto identificar las condiciones ambientales que se asocian con la presencia de especies (Pearson, 2007).

El objetivo del modelamiento de nicho es predecir la idoneidad de un espacio ecológico, el cual es típicamente proyectado en un área geográfica. El producto es un área predicha para la presencia de la especie en función de su nicho fundamental (Hutchinson,

1957; Phillips, 2004).

4.5.2 MODELAMIENTO DE NICHO ECOLÓGICO

Con la finalidad de determinar si hay diferencias de nicho entre grupos genéticos de *Hypsiboas pellucens* se compararon los modelos de nicho entre grupos. Basándose en modelos paleoclimáticos de especies se generaron mapas de estabilidad que proporcionaron información sobre la diversidad genética. Estos modelos consideran condiciones actuales y pasadas (21 mil años atrás) para predecir áreas estables (regiones en las que se predijeron las especies para ocupar un lugar independientemente del período de tiempo) y áreas inestables (Carnaval *et al.*, 2009).

Si el enfoque de predicción de diversidad actual es correcta, las especies deben mostrar (1) una mayor diversidad genética dentro de refugios, (2) menos diversidad en regiones inestables, (3) ausencia de patrones genéticos en áreas inestables dado que la colonización ha sido muy reciente y (4) una fuerte estructura filogeográfica entre refugios lo que muestra la larga persistencia de poblaciones en áreas aisladas (Carnaval *et al.*, 2009).

Para el modelamiento de nicho se utilizaron las localidades de individuos secuenciados e individuos no secuenciados de localidades cercanas a las de individuos secuenciados (Anexo 5). Las coordenadas geográficas de cada localidad fueron verificadas mediante los programas Google Earth y ArcView (ESRI 2000). Las localidades de ubicación dudosa fueron excluidas del análisis.

Las capas ambientales presentes y pasadas fueron obtenidas de la base de datos de WorldClim, las cuales presentan la siguiente área: longitud: Min= -81.008333 Max= -75.183333 y latitud: Min= -5 Max= 1.458333.

Las capas ambientales presentes, basadas en condiciones climáticas entre los años 1950

y 2000, tienen una resolución de 30 arc/segundos (pixel de 1km²; Hijmans *et al.*, 2004) mientras que las capas ambientales pasadas, basadas en condiciones climáticas de hace 21000 años (último máximo glacial), tienen una resolución de 2.5 arc/minutos (pixel de 5 km²; Hijmans, *et al.* 2005).

Debido a que las 19 variables climáticas están altamente correlacionadas entre sí, se eliminaron algunas y se retuvieron ocho variables que en estudios previos han sido identificadas como importantes para el modelamiento (Anexo 6; Menéndez y Graham, 2013).

Los modelos fueron generados usando el método de Máxima Entropía (MAXENT 3.3.3, Phillips *et al.* 2006), que tiene como propósito caracterizar distribuciones de probabilidad a partir de información incompleta, es decir, cuando no se tienen datos de ausencia para la especie (Pearson 2007; Phillips 2004; Phillips y Dudik, 2008). MAXENT utiliza las características ambientales del área donde una especie ha sido registrada para predecir su distribución, utilizando únicamente datos de presencia (Phillips *et al.* 2006; Phillips *et al.* 2008). El resultado del modelamiento es un estimado de la probabilidad de encontrar las condiciones apropiadas para la especie en un área geográfica determinada. Los valores logísticos varían de 0 a 1 siendo 0 la más probabilidad más baja (Kumar y Stohlgren 2009).

Debido a que cada clado presentó < 25 localidades de presencia, para probar la efectividad del modelo, se usó la validación *Jackknife* desarrollada por Pearson *et al.* (2007). Cada localidad observada fue excluida una vez del conjunto de localidades en cada clado y se construyó el modelo utilizando n – 1 localidades. El rendimiento del modelo se evaluó en base a la capacidad de cada modelo para predecir la localidad excluida del conjunto de datos de entrenamiento. Con el fin de aplicar la prueba se usó el programa p-Value (Pearson *et al.* 2007).

Para obtener el modelo definitivo se incluyeron las localidades de cada clado por separado.

Para realizar el modelamiento de nicho con proyección al pasado, se realizó el mismo procedimiento de evaluación final del presente incluyendo las capas en formato ASCII del pasado.

Finalmente, tanto para presente como para pasado, se realizó un modelamiento incluyendo todas las localidades considerando a *H. pellucens* como un solo grupo.

4.6 CORRELACIÓN ENTRE DISTANCIAS GENÉTICAS Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

En este análisis se aplicó una prueba de Mantel para determinar si la variación genética está explicada por aislamiento por distancia geográfica. Esta prueba tiene como objetivo correlacionar dos matrices utilizando permutaciones. El coeficiente de correlación (R_o) se calcula desde las matrices originales y después se permutan los valores tanto de las columnas como de las filas. Si las matrices originales están correlacionadas, la disrupción ocasionada por las permutaciones aumenta el coeficiente de correlación, mientras que si las matrices no están correlacionada las permutaciones reducen el coeficiente de correlación (R_o) (Fortin et al., 2002). En este análisis se utilizó el programa GenAlEx 6.4 (Mantel, 1976; Peakall y Smouse, 2005).

4.7 DETERMINACIÓN DE ESPECIES

Con la finalidad de determinar si los resultados obtenidos corresponden a especies candidatas se tomó en cuenta la clasificación de Vieites *et al.* (2009), partiendo del análisis

molecular y la identificación de la divergencia genética, para considerarlas como especies candidatas no confirmadas (Unconfirmed Candidate Species - UCS), esto si los resultados muestran solamente una fuerte diferenciación genética y los datos de otras variables taxonómicas como morfología o bioacústica son insuficientes. Por otra parte, para determinarlas como especies candidatas confirmadas (Confirmed Candidate Species - CCS), los resultados deben mostrar que aparte de la diferenciación genética existe también un aislamiento reproductivo y al menos una diferencia fenotípica (Padial *et al* 2010; Vieites *et al.* 2009).

5. RESULTADOS

5.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS

Se obtuvieron secuencias de 42 individuos de *H. pellucens*, dos de *H. rubracylus* y cuatro del grupo externo para los genes mitocondriales 12S (~841 pb), 16S (~1457 pb) y ND1 (~962pb), y para el gen nuclear POMC (~562 pb) (Tabla 1). Los clados son alopátricos (Figura 1).

De cada una de las cinco particiones obtenidas en el análisis de Inferencia Bayesiana, se obtuvo un modelo evolutivo junto con los estimados de sus parámetros (Tabla 4). Al comparar las estrategias de partición mediante los factores bayesianos, el modelo con más particiones (cinco particiones) se vio favorecido frente a la estrategia de una partición, ya que los valores fueron mayores a 10.

En la filogenia resultante de genes combinados 12S, 16S, ND1 y POMC, bajo el criterio de Inferencia Bayesiana (Figura 2), se identificaron dos clados basales con un soporte muy alto de probabilidad posterior (>0.95). El primer clado está conformado por *Hypsiboas rubracylus* y el segundo por *Hypsiboas pellucens*. Este último a su vez contiene tres clados (A, B y C).

El clado A se distribuye exclusivamente en Durango y Lita (Provincia de Esmeraldas) y es hermano de los clados B y C.

El clado B se distribuye desde el suroccidente de Esmeraldas (Viche y Caimito) hasta el norte de Los Ríos, pasando por Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí. Este clado es hermano del clado C.

El clado C se distribuye en el centro y sur de la Región Costa de Ecuador y el extremo

noroeste de Perú, pasando por las provincias de Guayas, Cañar, Azuay, El Oro y Loja.

Los resultados de los análisis de Máxima Verosimilitud muestran una filogenia con una topología similar y alto soporte (>0.75) para las ramas de *H. pellucens*, con excepción de la rama donde diverge el clado B que presenta un bajo soporte.

Para la filogenia con el gen nuclear POMC bajo el criterio de Inferencia Bayesiana (Figura 3) hay poca resolución aunque se forman los clados *H. rubracylus* y *H. pellucens*.

En la topología de la filogenia resultante de los genes individuales (Figura 4–6) se puede observar que, aunque los clados no presentan un buen soporte, el clado A siempre se mantiene separado de los otros dos clados. Las distancias genéticas entre los diferentes clados se muestran en la Tabla 5. Para el gen mitocondrial 12S las distancias no corregidas p estuvieron en un rango de 2.6 a 3.2% entre los clados A y B, 3.1 a 3.4% entre A y C y 0.7 a 1.3% entre B y C.

5.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

Al revisar todos los individuos adultos de *H. pellucens* no se pudieron identificar diferencias morfológicas inequívocas entre clados. Por lo tanto, sólo se incluyeron en los análisis individuos adultos secuenciados e individuos no secuenciados de las mismas localidades. Se analizó un total de 114 machos (62 para el clado A, 33 para el clado B y 19 para el clado C) (Tabla 6) y 18 hembras (6 para el clado A, 9 para el clado B y 3 para el clado C; Tabla 7).

5.2.1. VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Al realizar la prueba de normalidad, de Kolmogorov-Smirnov, para machos y hembras

para cada variable, se observó que todas las medidas presentaban una distribución normal, excepto la variable de Ancho de la Cabeza para machos (Anexo4).

Los resultados de la prueba de t mostraron diferencias altamente significativas en LRC entre machos y hembras en los tres clados; sin embargo, esta diferencia es más evidente en el clado A ($p = <0.001$; Figura 7). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos al comparar las 9 variables morfométricas entre machos y hembras en el MANOVA ($p = <0.001$). Por consiguiente, los datos para machos y hembras fueron separados en análisis posteriores.

La tabla 8 y figura 7 muestran que los machos de mayor LRC pertenecen al clado B y C y los individuos del clado A son significativamente más pequeños; en el caso de las hembras, no se encontraron diferencias significativas entre los tres clados.

En el ACP de los machos se obtuvieron dos componentes principales con autovalores mayores que 1. Ambos explican el 59% de la variación total. El primer componente principal (35.03% de la variación) está positivamente correlacionado con las variables correspondientes al ancho de la cabeza (AC) y al largo de la cabeza (LC); mientras que el segundo componente (24.01% de la variación total) está positivamente correlacionado con el largo de la tibia (LTI) y el largo del fémur (LFE) (Tabla 9). La proyección de los machos sobre el CP1 y el CP2 no muestra grupos diferenciados y hay un alto nivel de solapamiento entre los tres clados. Sin embargo, existen diferencias significativas en el CP2 entre el clado C y los otros clados, presenta extremidades más largas. Por otra parte, el CP1 muestra diferencias significativas entre el clado A y los otros dos clados con respecto al tamaño de la cabeza, este clado presenta una cabeza más grande (Tabla 10; Figura 8).

Analizando las variables individuales del primer componente vemos que de igual manera, los machos del clado A tienen diferencias significativas, en el largo y ancho de la

cabeza, con los otros dos clados (Tabla 11), mientras que con las variables del segundo componente principal, solo se encuentra diferencias entre los clados B y C con la longitud del fémur, y con respecto a la longitud de la tibia el clado B es diferente de los otros dos clados (Tabla 12).

El ACP realizado para las medidas de las hembras dio como resultado dos componentes con autovalores mayores que 1. En conjunto los dos componentes explican el 56% de la variación total. El CP 1 (33,45% de la variación) está positivamente correlacionado con las variables correspondientes al largo de la tibia (LTI) y largo de la cabeza (LC), mientras que el CP 2 (23,32% de la variación) está positivamente correlacionado con el diámetro del tímpano (DT) (Tabla 13). Los resultados muestran una separación entre los clados B y C, marcada por el segundo componente principal (diámetro del tímpano); mientras que, en el primer componente principal, no hay una diferenciación clara entre los clados (Figura 9).

En cuanto a la comparación de los componentes principales para cada clado con respecto a las hembras: el CP1 (longitud de tibia y largo de la cabeza) nos indica que no existen diferencias significativas entre los tres clados (Tabla 14). El mismo resultado se obtiene al comparar las dos variables individualmente (Tabla 15). Por otra parte, al comparar el segundo componente principal (diámetro del tímpano) entre clados, el clado A sí presenta diferencias significativas de B y C, pero no hay diferencias entre los clados B y C. Los mismos resultados se obtuvieron al analizar la variable independiente (Tabla 14 y 16).

Se consideró la variable del tamaño del calcar independientemente del resto de variables, en la figura 10 vemos que no hay diferencias entre machos y hembras de los tres clados. Mientras que en la figura 11 se muestra que no hay una diferenciación entre clados si se considera este carácter.

5.2.2. VARIABLES CUALITATIVAS

Pese a que los tres clados son muy parecidos morfológicamente, en base a los registros fotográficos de los individuos vivos, se han encontrado algunos caracteres que los diferencian (Figura 12).

El clado A tiene membranas interdigitales rojas o naranjas, solo en este clado encontramos algunos individuos con el iris de color marrón (ej. QCAZ40271), aparte del iris de color crema que se presenta en los tres clados. Este clado también presenta un vientre amarillo y en los flancos poseen manchas un poco traslúcidas de color verde claro o amarillo.

El clado B se caracteriza por tener manchas rojas o naranjas en los flancos y muslos. Al igual que el clado A este grupo también presenta el vientre de color amarillo y las membranas de color naranja, aunque los colores son menos intensos en estas dos características.

El clado C se diferencia de los otros dos clados por el color de su vientre, que es totalmente blanco o crema claro. Las membranas interdigitales tienen un color verde claro con una tonalidad naranja pálida. Los flancos son blancos aunque apenas se pueden ver unas manchas rojizas.

Por otro lado, después de revisar los individuos preservados, no se encontró ningún carácter que permita diferenciar los clados evidenciados en los análisis moleculares. Por ejemplo, el patrón de manchas de los flancos difiere entre el clado A y B en vida; sin embargo, en los individuos preservados estas manchas son de color verde oscuro y traslúcidas en ambos clados.

5.3. CANTOS DE ANUNCIO

Se encontró dos tipos distintos de cantos con algunas variaciones dentro de cada clado. El primer canto consiste de 1–8 notas que suenan como un “cuac” y el segundo varia de 2–5 notas, donde las primeras notas suenan como un “cuac” y la última nota es distinta a las primeras, pues es pulsada y suena como un “krrrrr”.

A continuación se realiza un descripción cualitativa de los cantos de anuncio para cada clado. Debido a la falta de muestras no se realizaron comparaciones estadísticas entre clados.

5.3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CANTOS PARA CADA CLADO

Clado A

Se encontró un único individuo (QCAZ 51870) cantando en el poblado de Durango (Provincia de Esmeraldas). Cantaba junto a otro macho (el cual nunca cantó), en una zona inundada perchando a unos 30 cm del agua.

El primer canto consiste en una nota (Figura 13 a-b); el promedio de la duración del canto es de 0.182 ± 0.006 s y del tiempo de subida es de 0.018 ± 0.005 s. La frecuencia aumenta desde el inicio hasta el final de la nota. La frecuencia dominante promedio es 1649.46 ± 356.62 Hz y la fundamental 861.34 ± 21.55 Hz. La frecuencia dominante se encuentra en la tercera armónica (1718.36 ± 76.75 Hz) (Tabla 17).

Hay un segundo tipo de canto (Figura 13 c-d) en el que la primera nota tiene una frecuencia dominante menor a la del primer canto (1184.3 Hz). La duración promedio de la primera nota es 0.682 s y el tiempo de subida 0.021 s. Las frecuencias dominante y fundamental son distintas (1184.3 Hz y 796.7 Hz respectivamente). La frecuencia dominante está en la segunda armónica. Además hay una segunda nota completamente distinta a la primera. Tiene una duración de 0.489 s y presenta 27 pulsos. A diferencia de la primera nota,

la frecuencia dominante promedio es 1270.5 Hz y el tiempo de subida 0.259 s (Tabla 18).

Clado B

Las grabaciones fueron realizadas en la Unión del Toachi (Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas), Mindo (Provincia Pichincha) y Los Bancos (Provincia Pichincha) (Figuras 14). Los individuos estuvieron cantando cerca de cuerpos de agua, perchando a unos 10 cm sobre el agua.

El primer tipo de canto tiene de una a cinco notas seguidas, cada una de las cuales suena como un “cuac”. El promedio de duración del canto es 0.345 ± 0.18 s y del tiempo de subida es 0.2402 ± 0.003 s. La frecuencia dominante promedio es 1134.84 ± 218.78 Hz y la frecuencia fundamental promedio es 567.06 ± 134.94 Hz. La frecuencia dominante se encuentra en la tercera armónica (1231.34 ± 173.22 Hz) (Tabla 17).

El segundo tipo de canto presenta una duración promedio de 0.8 ± 0.1 s y está conformado de dos notas: la primera nota, tiene una frecuencia dominante promedio de 1259.17 Hz a la del primer canto. El tiempo de duración de la nota es de 0.055 ± 0.009 s y un tiempo de subida de 0.023 ± 0.004 s. La frecuencia dominante es 1259.1 ± 230.57 Hz y la frecuencia fundamental es de 529.4 ± 149.3 Hz. La frecuencia dominante está en la tercera armónica. La segunda nota del segundo canto es muy distinta de la primera. Tiene una duración promedio más larga que la primera nota, 0.56 ± 0.39 s con un promedio de 13.19 ± 3.14 pulsos. Su frecuencia dominante promedio es 1570.9 ± 1655.5 Hz (Tabla 18).

Clado C

Las grabaciones fueron realizadas en (Camilo Ponce Enriquez – Campamento Minero Gabi) (Provincia Azuay), Buenaventura (Provincia El Oro) y en Puyango (Provincia Loja)

(Figuras 15). Los individuos se encontraban cantando al borde de riachuelos perchando a 1 m del suelo.

El primer tipo de canto tiene una variación de una a ocho notas, cada una de las cuales suena como un “cuac”. El promedio de duración del canto es 0.119 ± 0.689 s, el tiempo de subida es 0.016 ± 0.004 s y la duración de la nota es 0.042 ± 0.008 s. La frecuencia dominante promedio es 1334.52 ± 269.38 Hz y para la fundamental es 615.1 ± 121.3 Hz. La frecuencia dominante está en la tercera armónica (1392.03 ± 133.58 Hz) (Tabla 17).

El segundo tipo de canto presenta una duración promedio de 0.657 ± 0.026 s y tiene dos notas: la primera nota, tiene una frecuencia dominante promedio ligeramente mayor a la del primer canto (1335.2 ± 78.8 Hz). Presenta una duración promedio de 0.037 ± 0.007 s y un tiempo de subida de 0.013 ± 0.003 s. La frecuencia dominante es de 1335.2 ± 78.8 Hz y la frecuencia fundamental es de 607.3 ± 73.55 Hz. La frecuencia dominante está en la 3ra armónica. La segunda nota del segundo canto es completamente distinta a la primera. Tiene una duración promedio más larga que la primera nota con 0.87 ± 0.99 s. Esta nota presenta un promedio de 12.32 ± 2.28 pulsos. Presenta una frecuencia dominante promedio de 1026.46 ± 260.7 Hz (Tabla 18).

El ACP realizado para las variables acústicas dio como resultado dos componentes con autovalores mayores que 1. En conjunto los dos componentes explican el 68.6% de la variación total. El primer componente principal (41.3% de la variación) está positivamente correlacionado con las variables correspondientes a la frecuencia dominante de la tercera armónica, mientras que el segundo componente principal (27.3% de la variación) está negativamente correlacionado con las variables correspondientes a la duración del canto (Tabla 19). Los resultados muestran que no hay una diferenciación clara entre los clados (Figura 16).

5.4. ENVOLTURA AMBIENTAL

Los resultados del análisis multivariado para las 8 variables ambientales muestran diferencias entre los tres clados ($F= 10026$; $p<0.001$).

Las variables ambientales, Temperatura Media Anual y Precipitación Anual se separan entre los tres clados (Figura 17) y al realizar una prueba de t se muestra que el clado B presenta diferencias significativas con respecto a los clados A y B en temperatura media anual. El clado C se diferencia de los otros clados en precipitación anual (Tabla 20).

En el ACP de las ocho variables ambientales se obtuvieron dos componentes principales con autovalores > 1 . Juntos explican el 76.8% de la variación total. El primer componente principal (50.8% de variación) está positivamente correlacionado con las variables correspondientes a la máxima temperatura del mes más caliente y la temperatura media anual mientras que el segundo componente (26% de variación) está positivamente correlacionado con las variables correspondientes a la temperatura mínima del mes más frío y negativamente correlacionado con las variables correspondientes a la tasa de temperatura media diurna (Tabla 21). La proyección de los individuos sobre el CP1 y el CP2 (Figura 18) muestra que cada clado ocupa un espacio ambiental diferenciado. El Clado C se separa de los otros dos clados en el CP1 y el Clado A se separa de los otros dos clados en el CP2.

Mediante una prueba de t se encontraron diferencias en el CP 1 entre el Clado C y los clados A y B ($p < 0.001$), pero no hubo diferencias entre los clados A y B. Para el CP 2 hubo diferencias significativas entre los tres clados (Tabla 22).

5.5. MODELAMIENTO DE NICHO

Se realizaron cuatro modelos de nicho ecológico para presente y cuatro para pasado,

(1) considerando solamente el clado A, (2) considerando solamente el clado B, (3) considerando solamente el clado C y (4) tomando en cuenta todos los individuos como un solo grupo. Los modelos se basaron en las localidades listadas en el Anexo 5.

Los resultados de la evaluación del rendimiento de los modelos de nicho para los tres clados, a través de la prueba Jackknife, presentaron una tasa de éxito alta ($p < 0.001$), lo que muestra que estos modelos son mejores que los modelos generados al azar, asegurando una buena capacidad predictiva en el modelo final.

Considerando a *H. pellucens* en conjunto, el modelamiento de nicho presente muestra una alta probabilidad de ocurrencia en las regiones donde se encuentran los clados A y B, mientras que para el clado C la predicción es menos probable (Figura 19). El modelo de nicho para el último glacial máximo muestra un cambio en el área de distribución (Figura 20). Hay un aumento del área de ocurrencia en la costa central y una disminución en la costa norte, especialmente en las zonas de presencia actual del clado A.

Clado A

En el primer modelo de presente solo el 1.1% de la superficie del área de estudio cuenta con las características apropiadas para este clado. El modelo se realizó con las localidades de Durango, Lita (Provincia Esmeraldas) y localidades cercanas a estos dos puntos; sin embargo, en el modelamiento de nicho ecológico (MNE) se incluyen zonas de predicción más amplias, llegando hasta el sur-oeste de Colombia (Figura 21).

Este modelo dio como resultado un valor de 0.99 para el área bajo la curva (AUC) y las variables climáticas más importantes fueron Estacionalidad de la temperatura y Tasa de temperatura media diurna que explican un 41.5% y 29.1% de la distribución, respectivamente (Anexo 7).

La proyección hacia el pasado (Figura 22) presenta un área de distribución en Ecuador y Colombia, desde la región norte de la provincia de Esmeraldas hasta el suroccidente de Colombia.

Clado B

En el modelo de presente el 5.4% de la superficie del área de estudio cuenta con las características apropiadas para este clado (Figura 23).

Este modelo dio como resultado un valor de 0.987 para el área bajo la curva (AUC) y las variables climáticas más importantes fueron precipitación del trimestre más caliente y precipitación del trimestre más frío que explican un 63.3% y 19.8% de la distribución, respectivamente (Anexo 8).

El modelo para el último glacial máximo presenta un área de distribución en la parte central del Ecuador (Figura 24).

Clado C

El modelo de presente muestra que el 14.1% de la superficie del área de estudio cuenta con las características apropiadas para este clado (Figura 25).

Este modelo dio como resultado un valor de 0.919 para el área bajo la curva (AUC) y las variables climáticas más importantes fueron precipitación del trimestre más frío y temperatura media anual que explican un 79.5% y 17.4% de la distribución, respectivamente (Anexo 9).

El modelo del pasado presenta una distribución en la región sur del Ecuador llegando hasta Perú (Figura 26).

La figura 27 muestra el mapa de estabilidad ambiental desde el pasado hasta el

presente y es claro notar que este modelo está mucho más relacionado con el modelo de predicción del clado B, ya que el nicho que se ha conservado cae dentro del área de distribución de este clado.

5.6. CORRELACIÓN ENTRE DISTANCIAS GENÉTICAS Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

Los resultados muestran que para el clado A C no existe una correlación entre distancias geográficas y genéticas ($R_o = 0.257$; $p = 0.106$). Por otra parte en los clados B y C la correlación si fue significativa ($R_o = 0.744$, $p = 0.001$; $R_o = 0.312$; $p = 0.038$, respectivamente; Figura 28a).

En la figura 28b se muestran la y se ve claramente que hay una diferenciación genética similar entre el clado A y los clados B y C a pesar de que sus distancias geográficas son diferentes.

6. DISCUSIÓN

Hypsiboas pellucens está formada por tres linajes diferentes con un alto soporte.

Fouquet *et al.* (2007) proponen que las distancias genéticas >3% en el gen 16S son un indicador de diferenciación interespecífica de los clados obtenidos. El clado A está separado de los otros dos por los promedios de las distancias p no corregidas (para el gen 12S) de 0.029 y 0.033 con respecto a B y C, respectivamente, mientras que el promedio de las distancias p no corregidas entre B y C sugiere que no hay diferencias (0.0097). Por lo tanto, la evidencia genética sugiere que *H. pellucens* podría ser un complejo de dos especies.

La filogenia realizada con el gen nuclear POMC (Fig. 3) no muestra ninguna separación entre los tres clados generados y esta falta de resolución sería producto de la baja tasa de evolución de este gen.

Con respecto a la relación de *H. pellucens* con *H. rubracylus*, los resultados sugieren que *H. rubracylus* se encuentra cercanamente relacionada a *H. pellucens*; sin embargo, esto no se puede inferir con mucha confianza porque no se incluyeron más especies del género *Hypsiboas*. *H. rubracylus* forma parte del complejo *H. albomarginata* del grupo de *H. albomarginata*. Su inclusión en el grupo de *H. pellucens* fue tentativa, y estuvo basada en su parecido morfológico con *H. pellucens* (Faivovich, 2005); es la especie hermana de *H. pellucens* pero es necesario incluir más especies que estén cercanamente relacionadas a *H. pellucens* para confirmarlo.

6.1. DIVERGENCIA MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

Después de revisar los caracteres taxonómicos cualitativos para cada clado se pudo

determinar que la estructura filogenética inferida es consistente con las diferencias morfológicas.

Tradicionalmente se ha identificado a *H. pellucens* en base a caracteres morfológicos cualitativos que están relativamente conservados en los tres grupos. Estos caracteres han ocultado la fuerte diferenciación genética subyacente. Esto indicaría que la evolución morfológica es muy conservada y este hallazgo es similar a lo reportado en hílidos Neotropicales como *Osteocephalus* (Ron *et al.* 2012) e *Hypsiboas* del complejo *fasciatus* (Funk *et al.* 2012); pese a esto es posible encontrar diferencias de coloración en membranas y flancos, entre los tres clados.

En cuanto a los caracteres morfométricos, se ha encontrado que el tamaño del cuerpo y la cabeza (largo y ancho de la cabeza) en machos son un buen carácter para distinguir el clado A de los otros dos clados, así mismo como el diámetro del tímpano y el ancho de la cabeza en las hembras.

Sin embargo, analizando otras variables morfométricas, como el tamaño de las extremidades posteriores, vemos que no aportan con una información clara para poder separar a los tres clados. De igual manera, la morfometría de las hembras es muy conservada en los tres clados y resulta más difícil poder clasificarlas.

6.2. DIVERGENCIA EN CANTOS DE ANUNCIO

Las señales de comunicación benefician a los individuos ya que les permite interpretar su entorno para conseguir recursos o para evitar depredadores (Dall *et al.* 2005). Del mismo modo, la comunicación juega un papel muy importante en la diversificación de especies y en el aislamiento reproductivo, principalmente porque los cantos permiten a las hembras elegir a

sus parejas (Cocroft y Ryan, 1995; Gerhardt, 1994). Es por esto que los cantos de anuncio en anuros presentan patrones singulares dentro de cada especie y por lo cual son considerados una buena herramienta para definir límites entre especies.

Sin embargo, para poder aprovechar al máximo la información generada por los cantos es necesario contar con un buen tamaño de muestra para hacer comparaciones entre grupos. En este trabajo no fue posible conseguir suficientes grabaciones de varias localidades y por esta razón queda la incógnita de si existen o no diferencias significativas entre los clados.

Entre los cantos analizados hay una gran variedad estructural con dos tipos de cantos; sin embargo, en los tres clados se encontraron los dos tipos de cantos.

De manera general, el clado A presenta cantos más agudos, es decir, con frecuencias más altas que los otros clados. Sin embargo, la comparación no es confiable ya que solo se dispone de la grabación de un solo individuo del Clado.

6.3. ENVOLTURA AMBIENTAL Y MODELAMIENTO DE NICHOS

El modelamiento de nicho ecológico es un instrumento que nos permite predecir la distribución geográfica del nicho de una especie (Martínez, 2010). Y ya que toma en cuenta variables ambientales, estas variables actúan como factores responsables de especiación. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de la envoltura ambiental, ya que claramente los clados se separan ambientalmente. El clado A se distribuye en regiones donde la temperatura y precipitación son altas, el clado B en regiones donde la precipitación es alta y aunque haya una variación en temperatura y finalmente el clado C se distribuye en regiones donde la temperatura es alta y hay poca precipitación. Esto permite concluir que existe una correspondencia entre la envoltura ambiental y la variación genética.

La noción de que los nichos ecológicos no puede ser infinitamente similares entre sí y el conocimiento de que el espacio ecológico es heterogéneo ha llevado a la idea de que para un entorno dado hay un número limitado de nichos disponibles que podrían ser potencialmente ocupados (Polechová y Storch, 2008). Pese a esta limitación de nichos *H. pellucens* ha tenido un aumento en su distribución al paso del tiempo (Glaciación – Holoceno); esto puede deberse a que las condiciones climáticas han variado en este período de tiempo permitiendo que el área con las condiciones óptimas aumente. Sin embargo, los modelos resultantes dan una representación cercana hacia posibles áreas de conservación y una perspectiva del cambio que ha ocurrido en estas zonas a través del tiempo mas no una distribución real. Ya que también existen interacciones entre especies (inter e intra específicas) que intervienen en la dinámica espacial de las especies y que no son incluidas en el modelamiento de máxima entropía.

Pero si consideramos la distribución de los tres clados de manera independiente, los nichos generados se encuentran geográficamente separados. La divergencia genética de estos clados parece estar acompañada de una diferenciación ecológica y estudios muestran que se pueden generar nuevos linajes a partir de una separación geográfica de un conjunto de especies ancestrales a conjuntos aislados de poblaciones (Wiens y Graham 2005).

Si tomamos en cuenta la distribución de los clados con las regiones biogeográficas del Ecuador podemos ver que el modelo de nicho con proyección en el presente tiene una distribución del clado A que se restringe a una región del Bosque Húmedo del Chocó. Mientras que para el clado B su distribución está en la mayor parte del Bosque piemontano occidental, luego en el Bosque húmedo del Chocó y una parte del Bosque Deciduo de la costa. Por otra parte, el clado C presenta una distribución en el Bosque Deciduo de la Costa, Bosque Piemontano occidental y Matorral Seco de la Costa.

La separación geográfica de un linaje en dos se considera una parte esencial de la

especiación alopátrica bajo muchos conceptos. Sin embargo, ya que hay individuos que no se incluyeron en este estudio (dado que no se pudo clasificarlos en los diferentes clados, en base a caracteres morfológicos) no es posible afirmar que presentan una distribución alopátrica.

Poblaciones de diferentes edades y tamaños tienen distintos niveles de diferenciación genética, es decir, poblaciones que se han mantenido por más tiempo presentan una mayor diversidad genética al igual que poblaciones grandes (Giles y Goudet, 1997). En contraste con el área de distribución del clado B, los clados A y C son menos estables. Este patrón es congruente con el nivel de diversidad genética puesto que es mayor en el clado B que en los clados A y C (Fig. 28a). Debido a que el clado B ha mantenido mayor estabilidad ambiental dentro de su rango, este clado tiene más diversidad genética.

Según la distribución de Padial *et al.* 2010 y Vieites *et al.* 2009, puede considerarse al clado A como especie candidata confirmada (CCS), al clado C como especie candidata no confirmada (UCS) y el clado B corresponde a *H. pellucens sensu stricto*, debido a que en este clado se encuentra la localidad más cercana al holotipo.

6.4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las variaciones molecular, morfológica y ecológica sugieren la existencia de dos linajes evolutivos independientes dentro de *Hypsiboas pellucens*, que son calificados como especies candidatas.

Sin embargo, molecularmente corresponden a tres grupos genéticos que ocupan rangos geográficos diferentes.

Morfológicamente es posible identificar a los individuos de cada uno de los tres clados en base a la coloración de las membranas, iris y manchas en los flancos y muslos.

Considerando las condiciones ambientales, también hay diferencias entre los tres

grupos, el clado A se distribuye en regiones con temperatura y precipitación alta, el clado B, al presentar un rango de distribución más amplio, se distribuye en regiones con una gran variación de temperatura pero con alta precipitación y finalmente el clado C se distribuye en regiones más secas, es decir, regiones con temperatura alta y baja precipitación.

Se observa mayor diversidad en la región estable (Clado B) ya que su diferenciación genética esta explicada por la distancia geográfica.

Los clados A y C, localizados fuera de la región estable, son genéticamente similares entre ellos al igual que los clados B y C.

No se pudo determinar posibles barreras geográficas debido a que, en este estudio, no se incluyeron a todos los individuos y por lo tanto no se consideraron todas las localidades de distribución de los individuos dentro de cada clado.

Se recomienda muestrear más localidades, principalmente aquellas que se predicen en el modelo de nicho para incluir más datos genéticos y bioacústicos.

7. LITERATURA CITADA

- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Brandley, M.C., Schmitz, A., Reeder, T.W. 2005. Partitioned Bayesian analyses, partition choice, and the phylogenetic relationships of scincid lizards. *Systematic Biology* 3: 373–390.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F., Rodriguez, M. T., Moritz, C. 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 6: 785–789.
- Castañeda, M., Queiroz, K. 2011. Phylogenetic relationships of the *Dactyloa* clade of *Anolis* lizards based on nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 784–800.
- Cocroft, R., Ryan, M. J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behavior* 49: 283–303.
- Coloma, L. A., Miranda-Leiva, A., Lötters, S., Duellman, W. E. 2007. A taxonomic revision of *Atelopus pachydermus*, and description of two new (extinct?) species of *Atelopus* from Ecuador (Anura: Bufonidae). *Zootaxa* 1557: 1–32.

Cornell Lab of Ornithology. 2003–2008. Raven pro. Versión 1.3. Bioacoustic Research Program. New York, United States of America.

Dall, S. R. X., Giraldeau, L. A., Olsson, O., McNamara, J. M., Stephens D. W. 2005. Information and its use by animals in evolutionary ecology. *Ecology and Evolution* 4: 187–193.

Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones–Havas S., Sturrock S., Thierer T., Wilson A. 2010. Geneious v5.3.4, Available from <http://www.geneious.com>

Duellman, W. E. 1971. The identities of some Ecuadorian Hylid frogs. *Herpetologica* 2: 212–227.

Duellman, W. E. 1974. A reassessment of the taxonomic status of some Neotropical hylid frogs. *Occasional papers Museum of Natural history*. 27: 1–27.

Duellman, W. E., Tueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. United States of America.

ESRI. 2000. Arc View v.3.2 ESRI

- 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* 294: 1–240.
- 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.
- Funk, W. C., Caminer, M. Ron, S. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society of London B* 279:1806-1814.
- Funk, W. C., Caminer, M. Ron, S. 2012. In Amazonian frogs there is much more diversity than meets the eye. *FrogLog* 100: 73.
- Gerhardt, H. C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 293–324.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systems Biology* 52: 696–704.
- Heyer, W. R., Maxson, L. R. 1982. Neotropical frog biogeography: paradigms and problems. *American Zoologist* 22: 397–410.

- Hijmans, R. J., Guarino, L., Bussink, C., Mathur, P., Cruz, M., Barrantes, I., Rojas, E. 2004
DIVA–GIS Manual. Sistema de Información Geografica para el Analisis de Datos de
Distribucion de Especies.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones and A. Jarvis, 2005. Very high
resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of
Climatology* 25: 1965–1978.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of
phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310–2314.
- Hutchinson G. E. 1957 Concluding remarks. *Cold Spring Harbos Symposia on Quantitative
Biology* 22: 415–427.
- Jansen, M., Bloch, R., Schulze, A., Pfenninger, M. 2011. Integrative inventory of Bolivia’s
lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica scripta* 40: 567–583.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid
multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research*
30: 3059–3066.
- Kumar, S., Stohlgren, T. 2009. Maxent modeling for predicting suitable habitat for
threatened and endangered tree *Canacomyrica monticola* in New Caledonia. *Journal
of Ecology and Natural Environment* 4: 94–98.

- Legendre, P. y Fortin, M. J. 1989. Spatial pattern and ecological analysis. *Vegetatio* 80: 107–138.
- Legendre, P. y Fortin, M. J. 2010. Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular Ecology Resources* 10: 831–844.
- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, 2da ed. New York: Cambridge University.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R. 2010. *Mesquite: A modular system for evolutionary analysis*. Versión 2.74. <http://mesquiteproject.org>.
- Martinez, N. 2010. *Apuntes sobre modelación de nichos ecológicos*. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, del Instituto de Ecología de la UNAM
- Menéndez, P. A., Graham, C. H. 2013. Evaluating multiple causes of amphibian declines of Ecuador using geographical quantitative analyses. *Ecography* 36: 1–14.

- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology* 7: 1–14.
- 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.
- Peakall, R., Smouse, P. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Pearson, R. G. 2007. Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. Synthesis. American Museum of Natural History. Available at <http://ncep.amnh.org>.
- Pearson, R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M., Peterson, A. T. 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* 34: 102–117.

- Phillips, S., Dudík, M., Shapire, R., 2004. A maximum entropy approach to Species Distribution Modeling. Proceedings of the 21st. International Conference on Machine Learning. Banff. Canada.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. and Scahpire, R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Phillips, S. J., Dudik, M. 2008. Modeling of species distribution with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31:161–175.
- Polechová, J., Storch, D. 2008. Ecological Niche, *Encyclopedia of Ecology* 2: 1088–1097.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 12535–1256.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer. Version 1.5.
<<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer/>>.
- Ron, S. R., Cannatella, D. C., Santos, J. C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 39:392–403.

Ron, S. R., Venegas, P. J., Toral, E., Read, M., Ortiz, D., Manzano, A. 2012. Systematics of the *Osteocephalus buckleyi* species complex (Anura, Hylidae) from Ecuador and Peru. *ZooKeys* 229: 1–52.

Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez–Muñoz, M. H. 2013. AmphibiaWebEcuador. Version 2013.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>>

SPSS, Inc. 2009. SPSS for Windows, release 17.0. SPSS Inc., Chicago, United States of America.

Suchard, M.A., Weiss, R.E., Sinsheimer, J.S., 2001. Bayesian selection of continuous time Markov chain. *Society for Molecular Biology and Evolution* 18: 1001–1013.

Torres–Carvajal, O., Queiroz, K. 2009. Phylogeny of hoplocercine lizards (Squamata: Iguania) with estimates of relative divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 31–43.

Venegas, P. J., Siu–Ting, K., Jordán, J. C. 2008. Amphibia, Hylidae, *Hypsiboas pellucens*: First country record, Peru. *Check List. Journal of Species and Distribution* 4: 214–217.

Vieites, D., Wollonverg, K., Andreone, F., Kohler, J., Glaw, F., Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar’s biodiversity evidenced by an integrative amphibian

inventory. PNAS 106: 8267–8272.

Werner, F. 1901. Ueber Reptilien and Batrachier aus Ecuador and Neu-Guinea. Verh. Zool.-bot. Gesell. Wien 50:593–614.

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.

Wiens, J. J., Graham, C. H. 2005. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology and Conservation Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36: 519–39.

Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence dataset under the maximum likelihood criterion. Ph.D. diiassertion, The University of Texas at Austin, United States of America.

8. FIGURAS

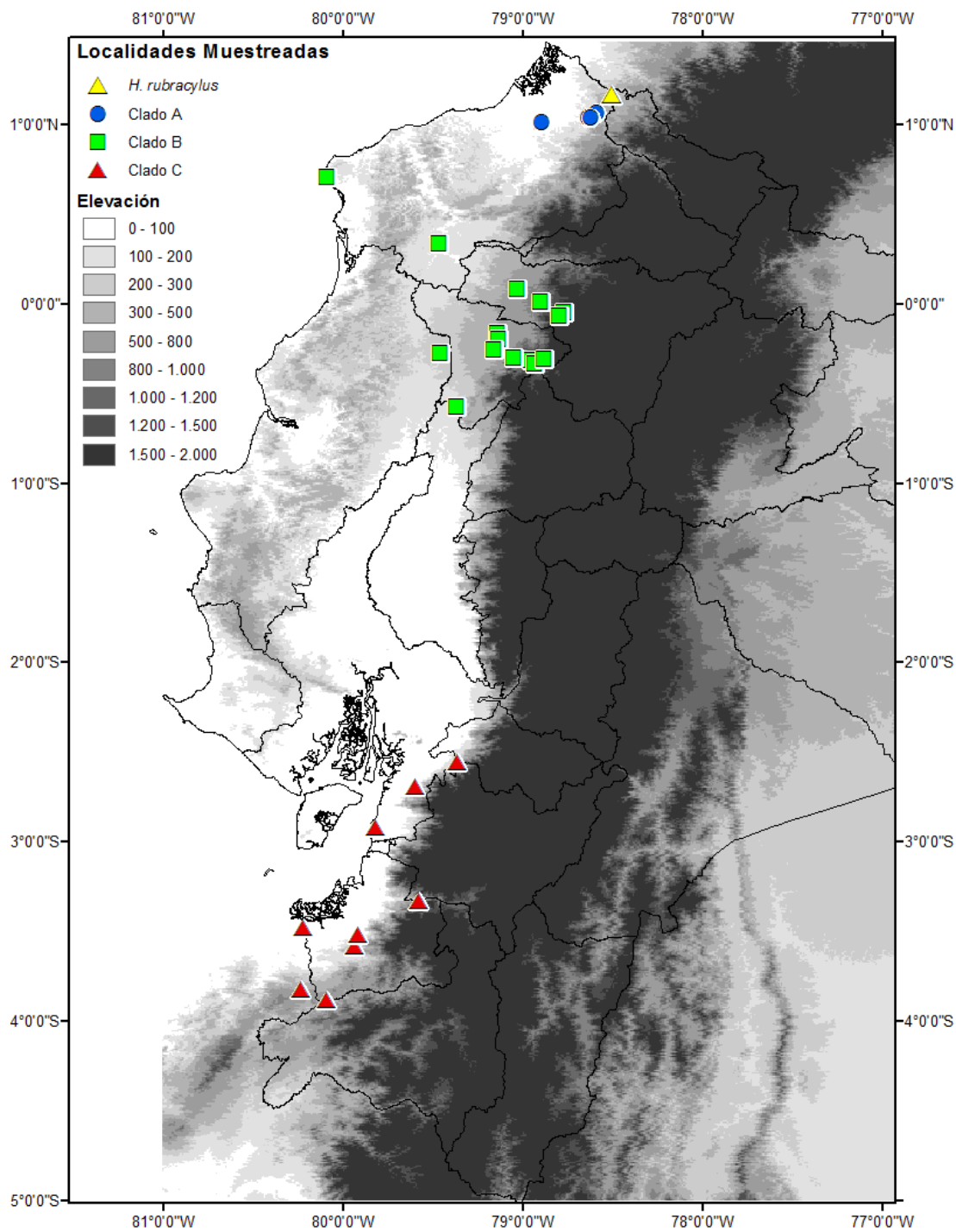


Figura 1. Mapa de distribución de los individuos secuenciados en este estudio. El triángulo amarillo corresponde a *H. rubracylus*, los círculos azules corresponden a *H. pellucens* del clado A, los cuadrados verdes a *H. pellucens* del clado B y los triángulos rojos a *H. pellucens* del clado C.

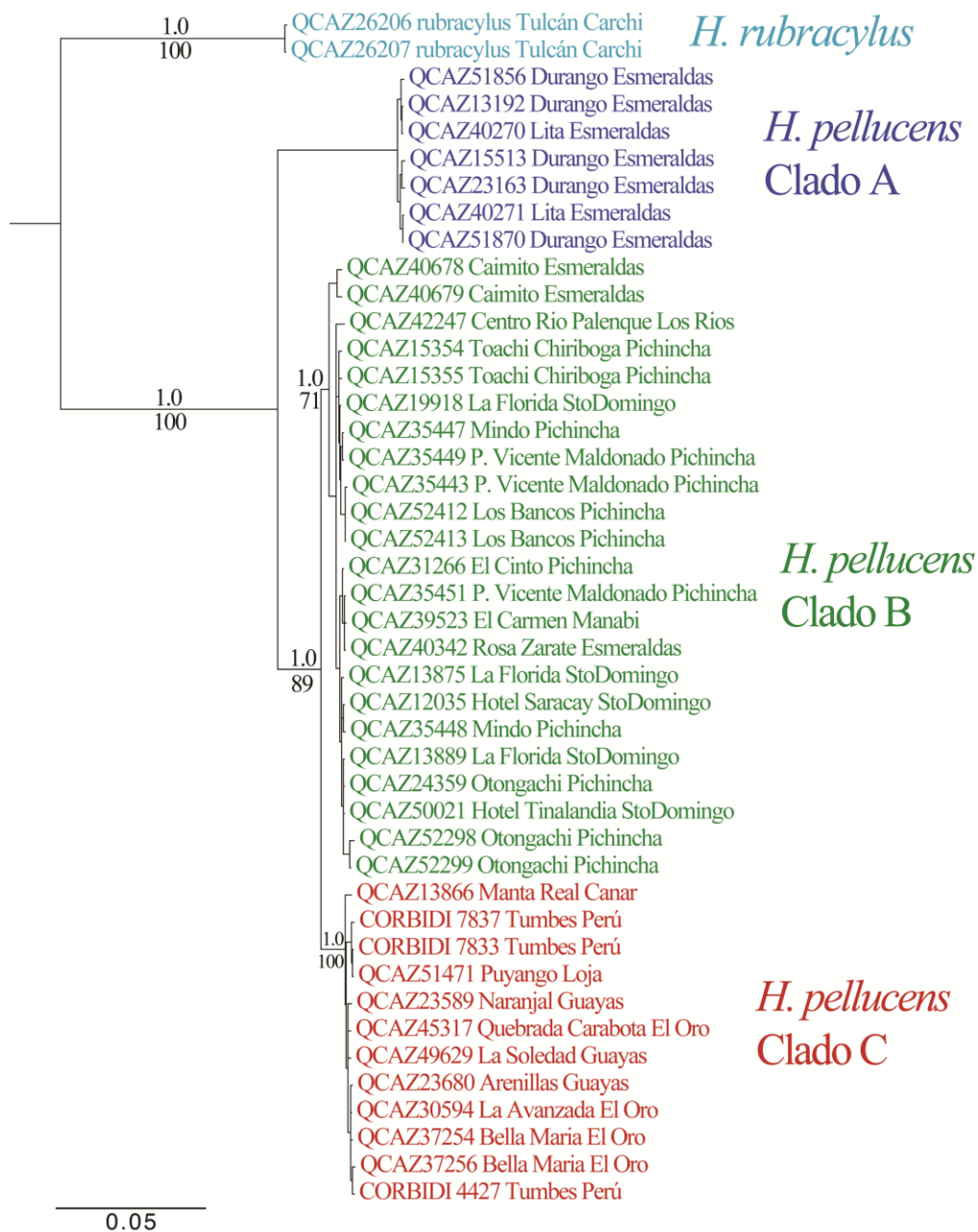


Figura 2. Filograma del análisis bayesiano de los genes combinados 12S, 16S, ND1 y POMC.

Se presentan los números QCAZ y localidades de colección para cada espécimen. Sobre las ramas se muestran los valores de las probabilidades posteriores obtenidos por Análisis Bayesiano y bajo las ramas los soportes del análisis de Máxima Verosimilitud ya que la topología es similar. Los colores muestran el clado al que pertenece cada individuo. La escala muestra el número de sustituciones por sitio.

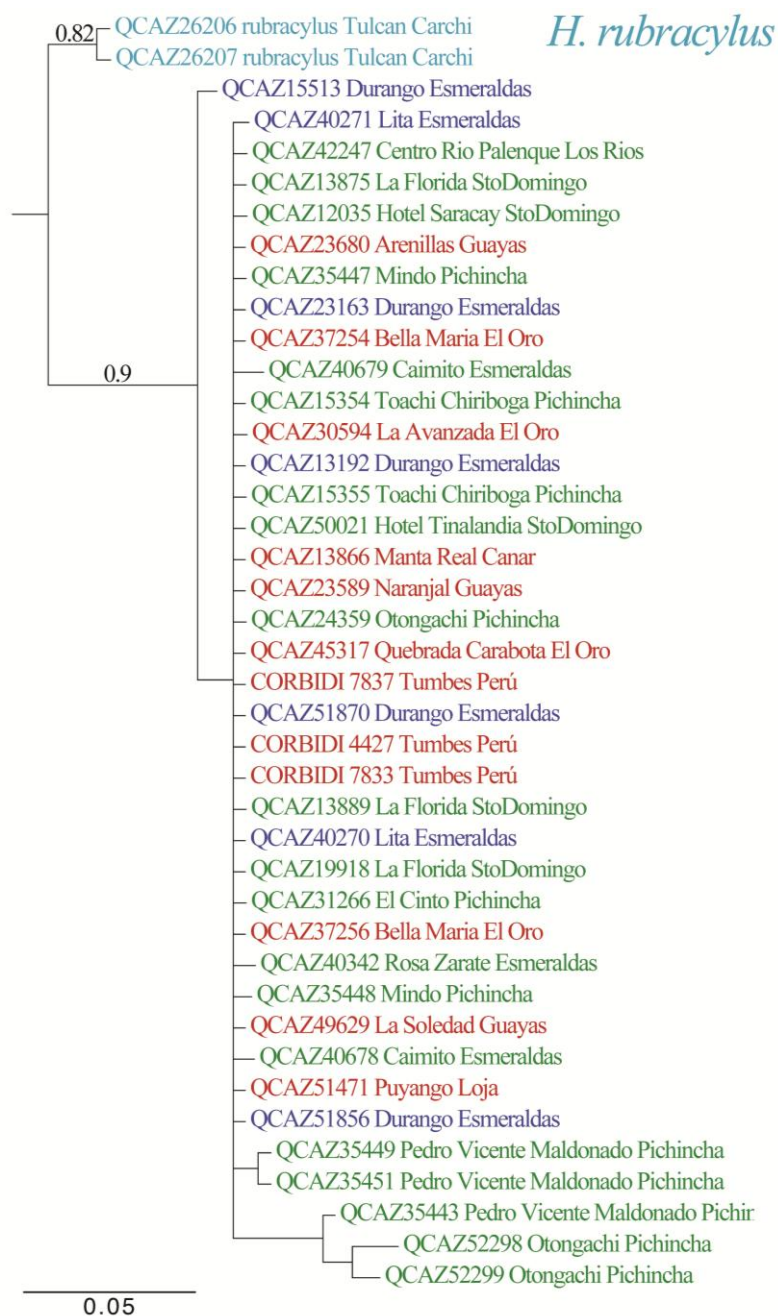


Figura 3. Filograma del análisis de inferencias bayesianas del fragmento del gen POMC. Se presentan los números QCAZ y localidades de colección para cada espécimen. Sobre las ramas se muestran los valores de las probabilidades posteriores sobre las ramas. Los colores representan el clado al que pertenece cada individuo. La escala muestra el número de sustituciones por sitio.

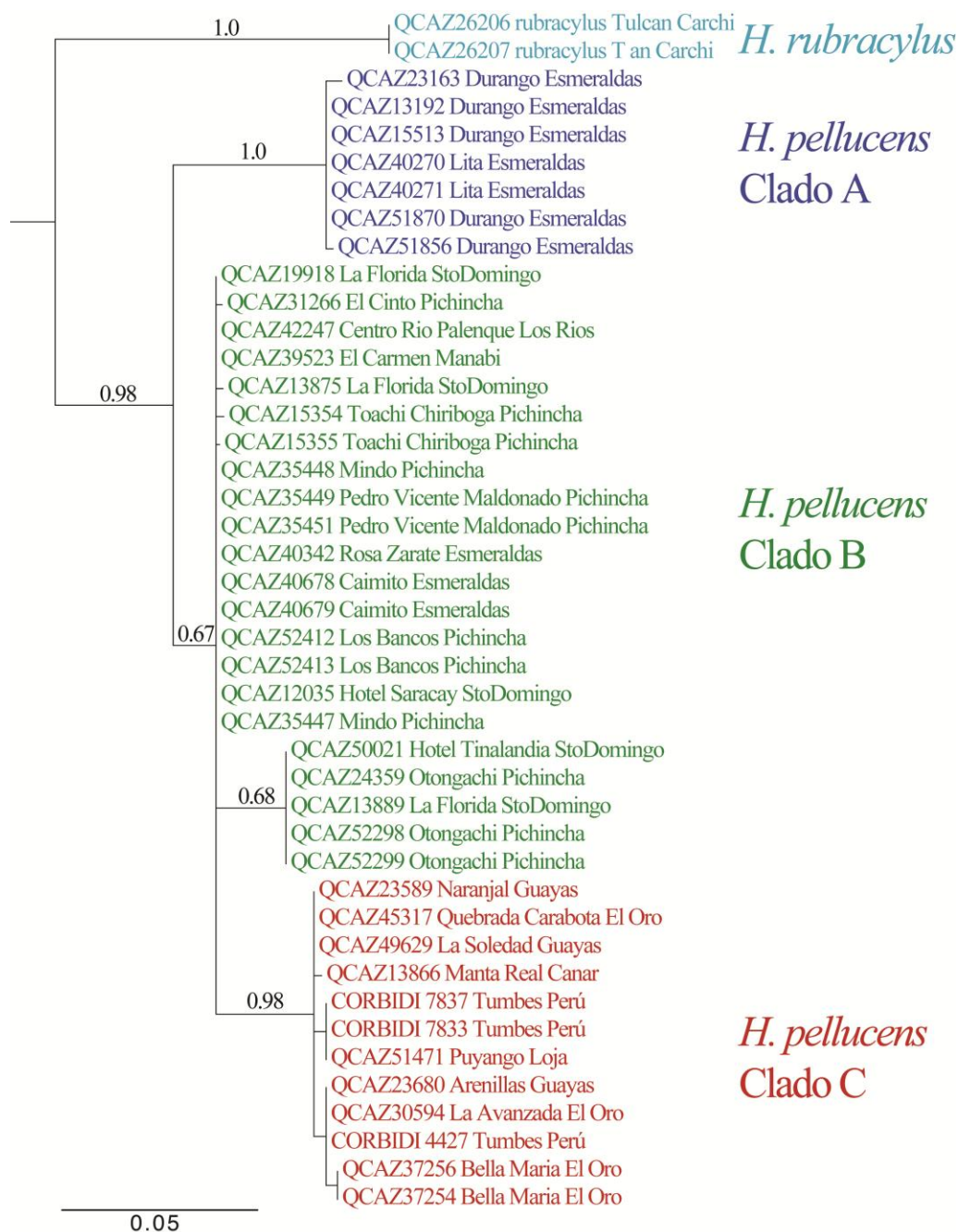


Figura 4. Filograma del análisis de máxima verosimilitud del fragmento del gen 12S. Se presentan los números QCAZ y localidades de colección para cada espécimen. Sobre las ramas se muestran los valores de los soportes del análisis de Máxima Verosimilitud. Los colores representan el clado al que pertenece cada individuo. La escala muestra el número de sustituciones por sitio.

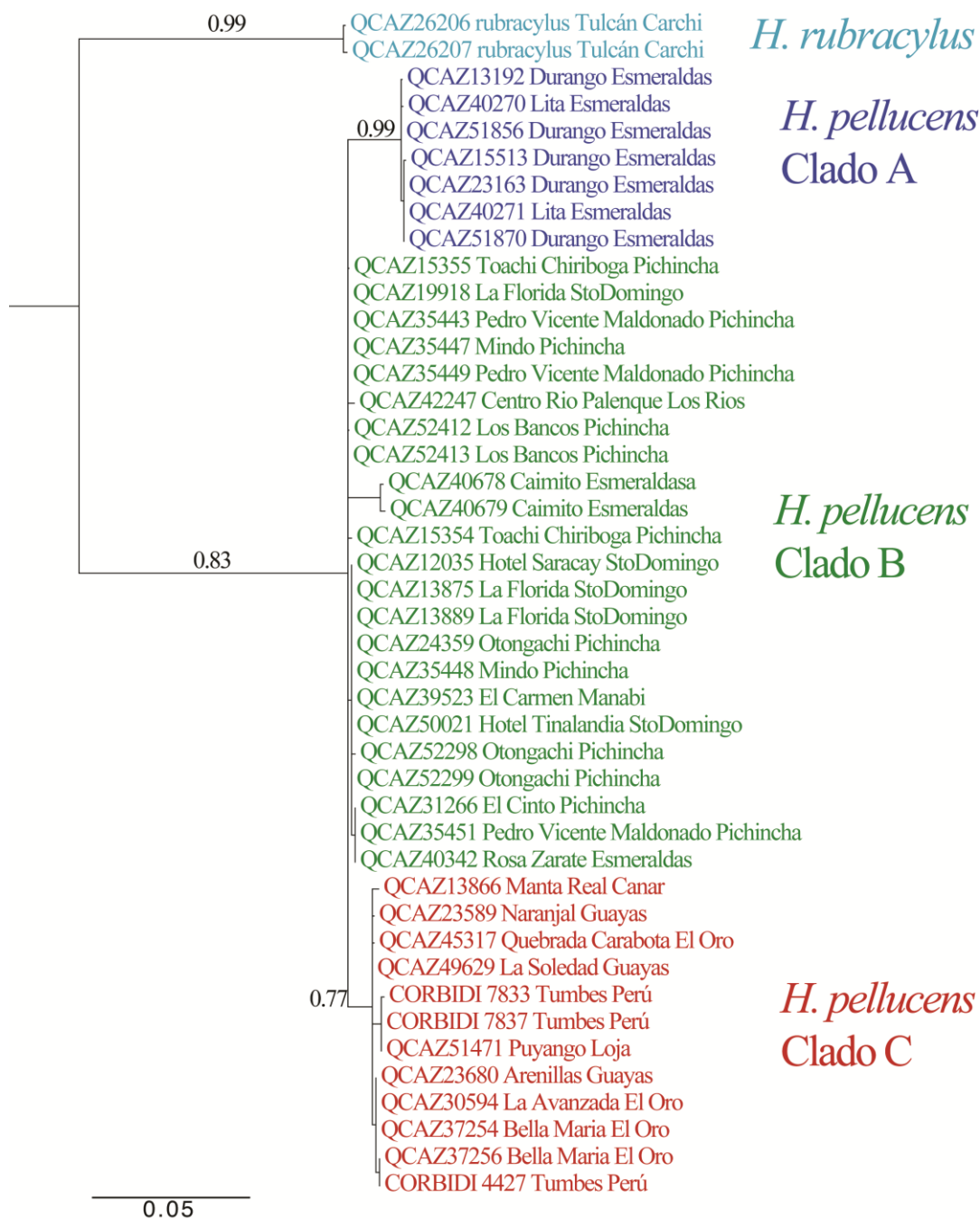


Figura 5. Filograma del análisis de máxima verosimilitud del fragmento del gen 16S. Se presentan los números QCAZ y localidades de colección para cada espécimen. Sobre las ramas se muestran los valores de los soportes del análisis de Máxima Verosimilitud. Los colores representan el clado al que pertenece cada individuo. La escala muestra el número de sustituciones por sitio.

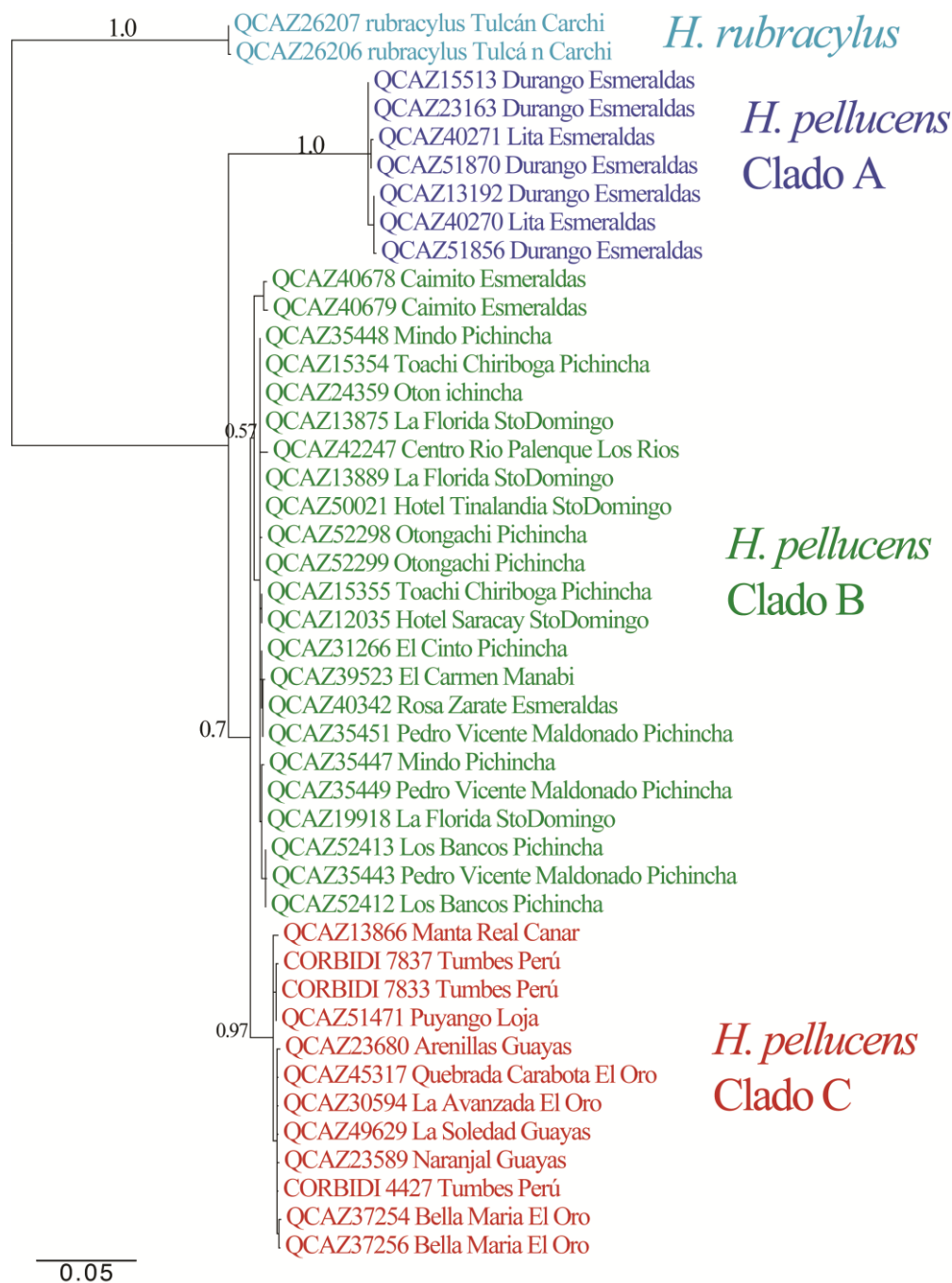


Figura 6. Filograma del análisis de máxima verosimilitud del fragmento del gen ND1. Se presentan los números QCAZ y localidades de colección para cada espécimen. Sobre las ramas se muestran los valores de los soportes del análisis de Máxima Verosimilitud. Los colores representan el clado al que pertenece cada individuo. La escala muestra el número de sustituciones por sitio.

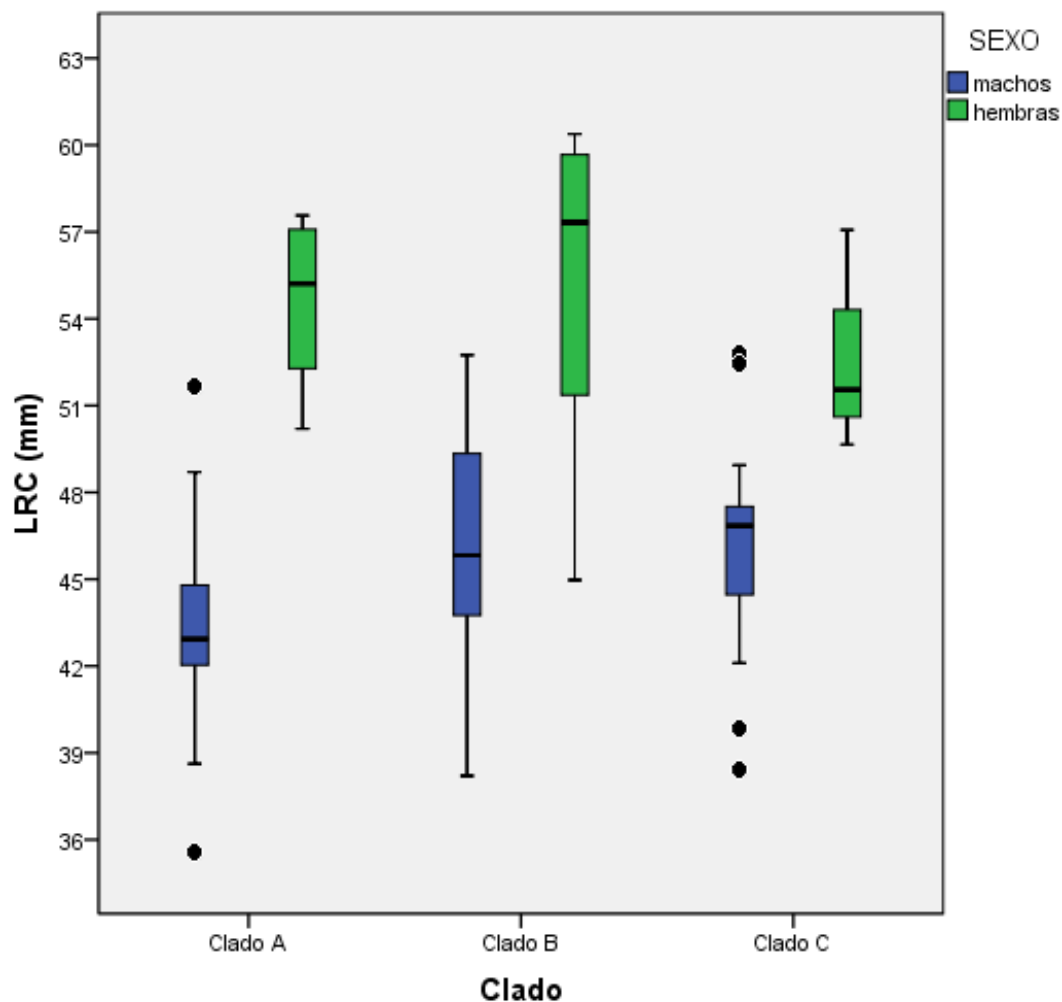


Figura 7. Diagrama de caja de la longitud rostro cloacal (LRC) de los machos adultos vs. hembras adultas de *Hypsiboas pellucens* para cada uno de los tres clados. Se muestra la media para cada clado (línea central de cada caja), la variación de los datos (rango intercuartil: longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error) y los datos extremos (puntos negros).

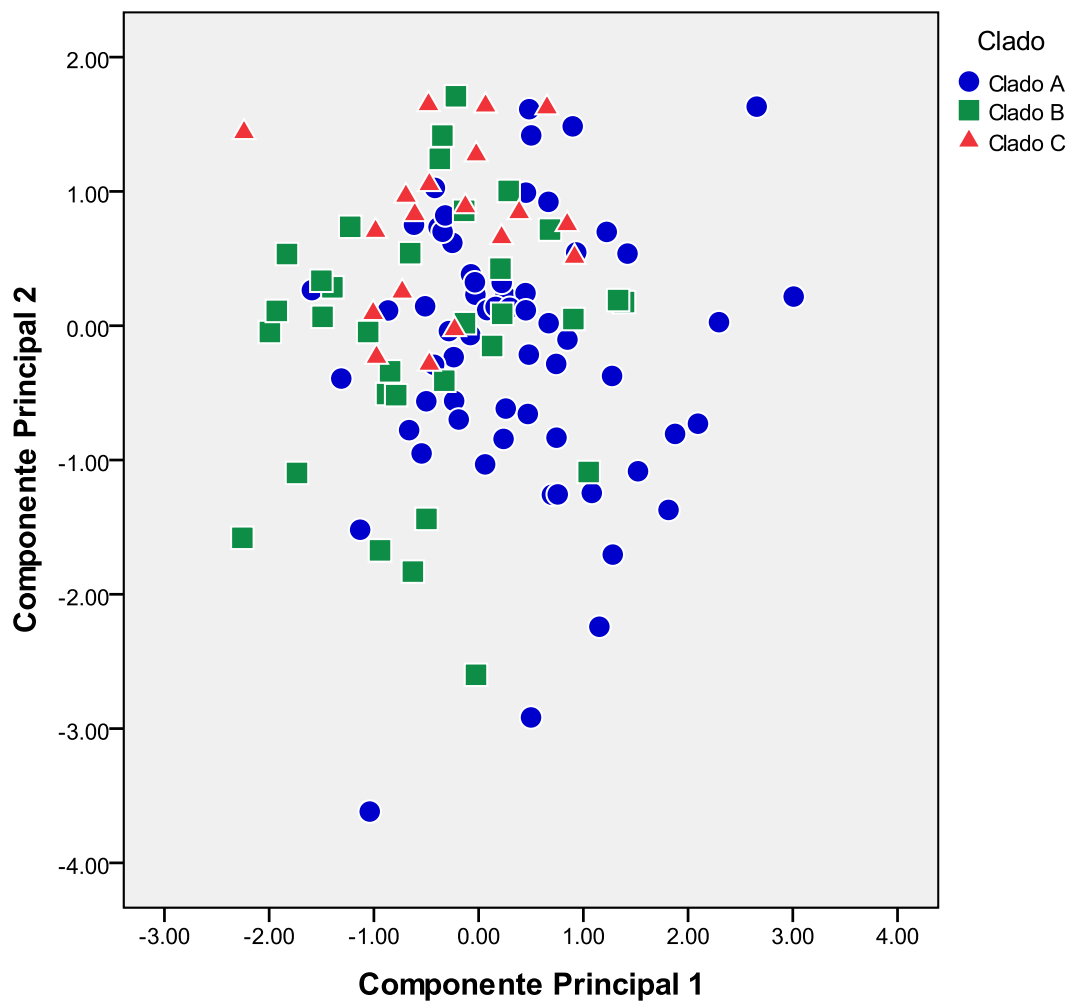


Figura 8. Proyección de las variables morfométricas de machos adultos de *Hypsiboas pellucens* sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales de ocho variables morfológicas.

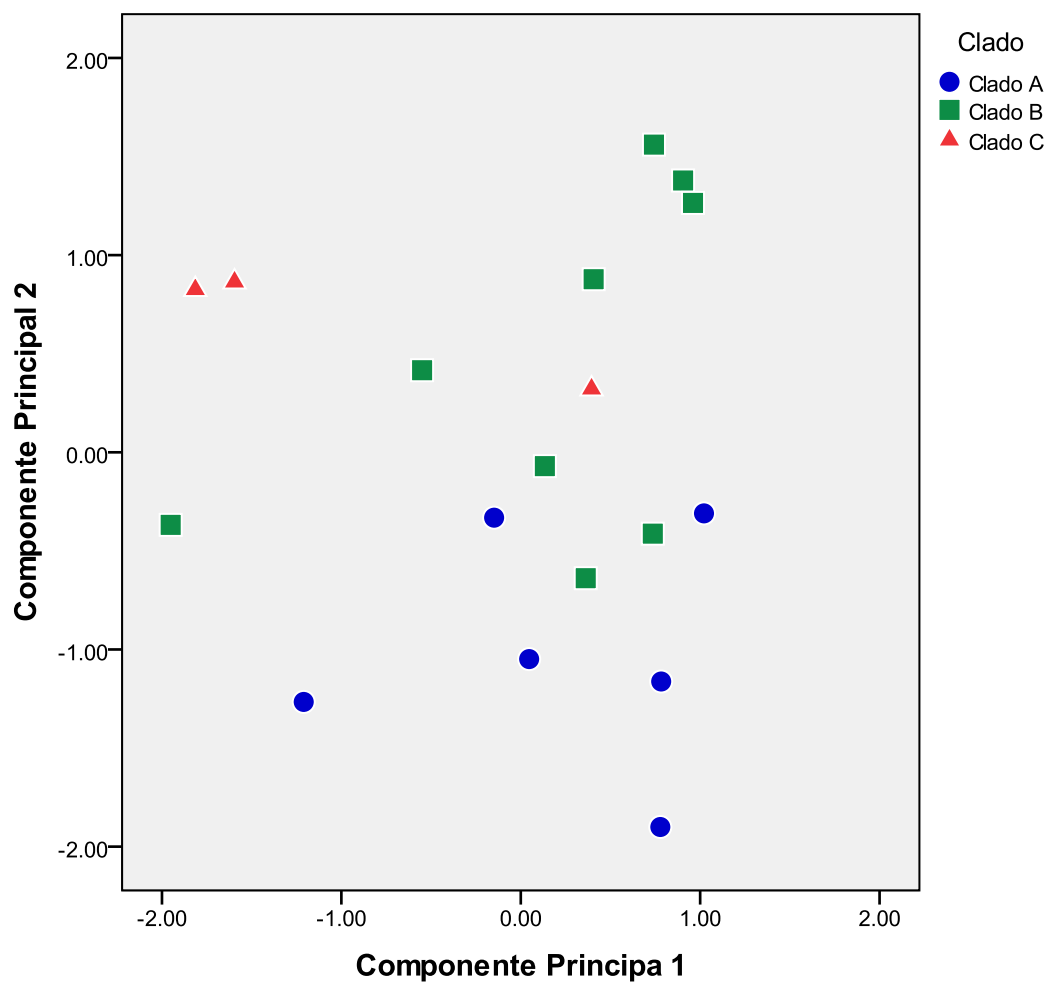


Figura 9. Proyección de las variables morfométricas de hembras adultas de *Hysiboas pellucens* sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales de ocho variables morfométricas.

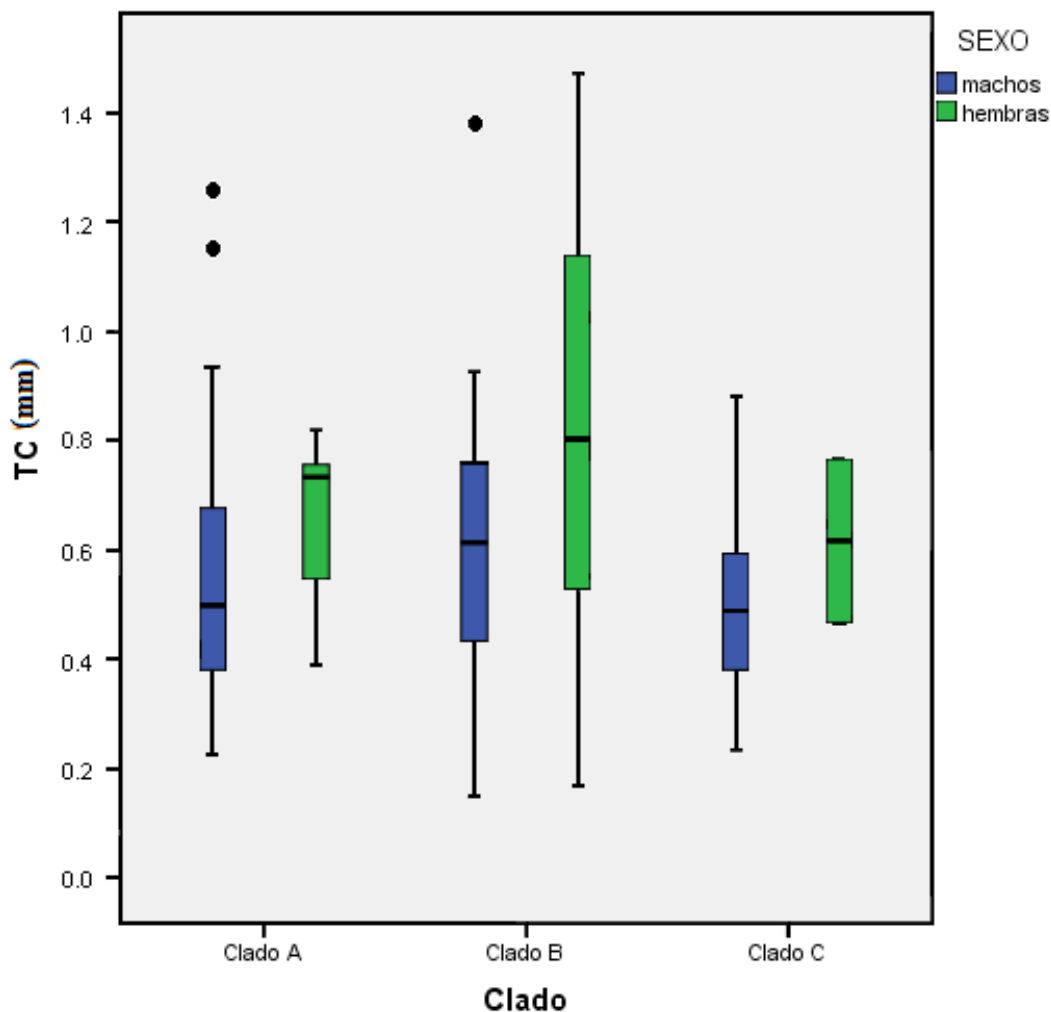


Figura 10. Diagrama de caja del tamaño del calcar (TC) de los machos adultos del complejo de especies *Hypsiboas pellucens*. Se muestra la media para cada clado (línea central de cada caja), la variación de los datos (rango intercuartil: longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error) y los datos extremos (puntos negros).

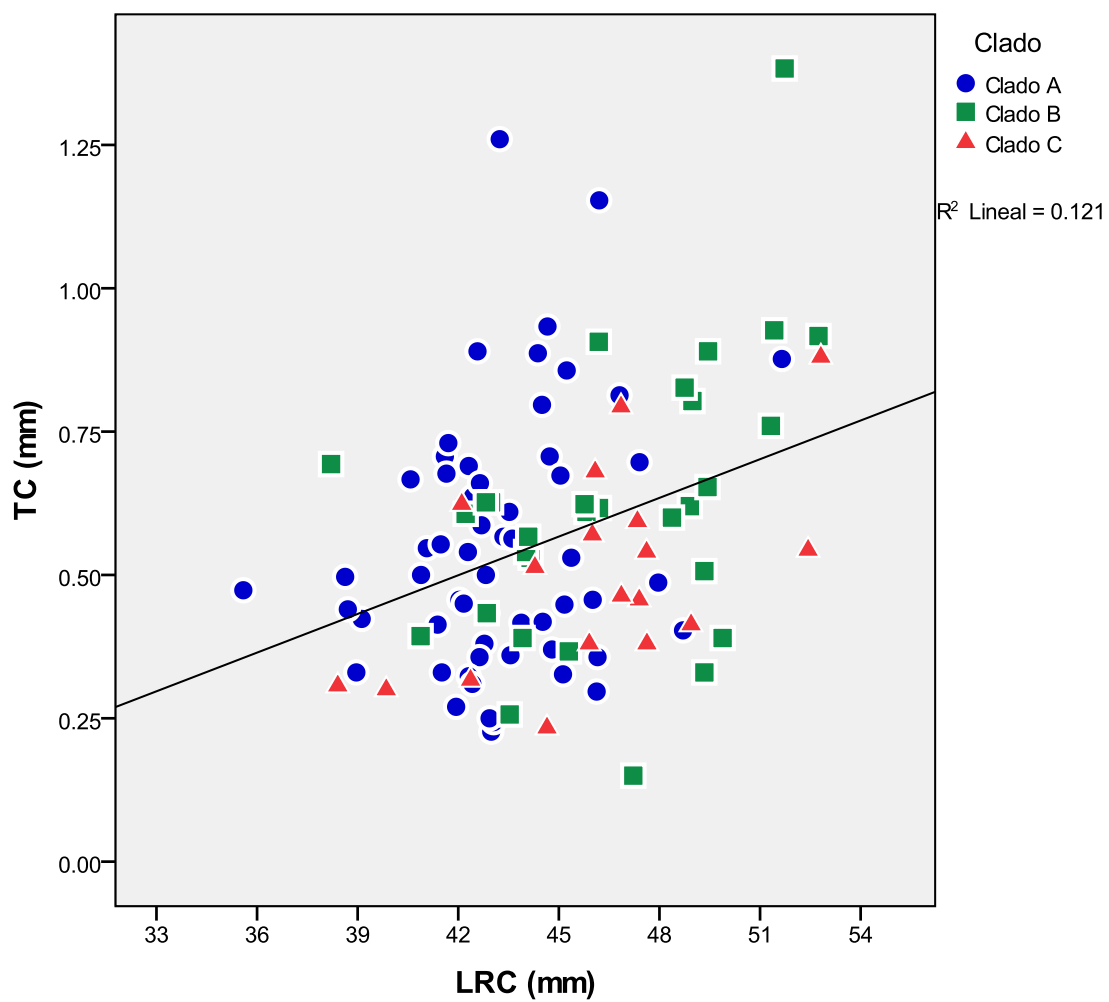


Figura 11. Regresión lineal entre la variable longitud rostro cloacal (LCR) y el tamaño del calcar (TC) para los clados A, B y C pertenecientes a *Hypsiboas pellucens* (machos).

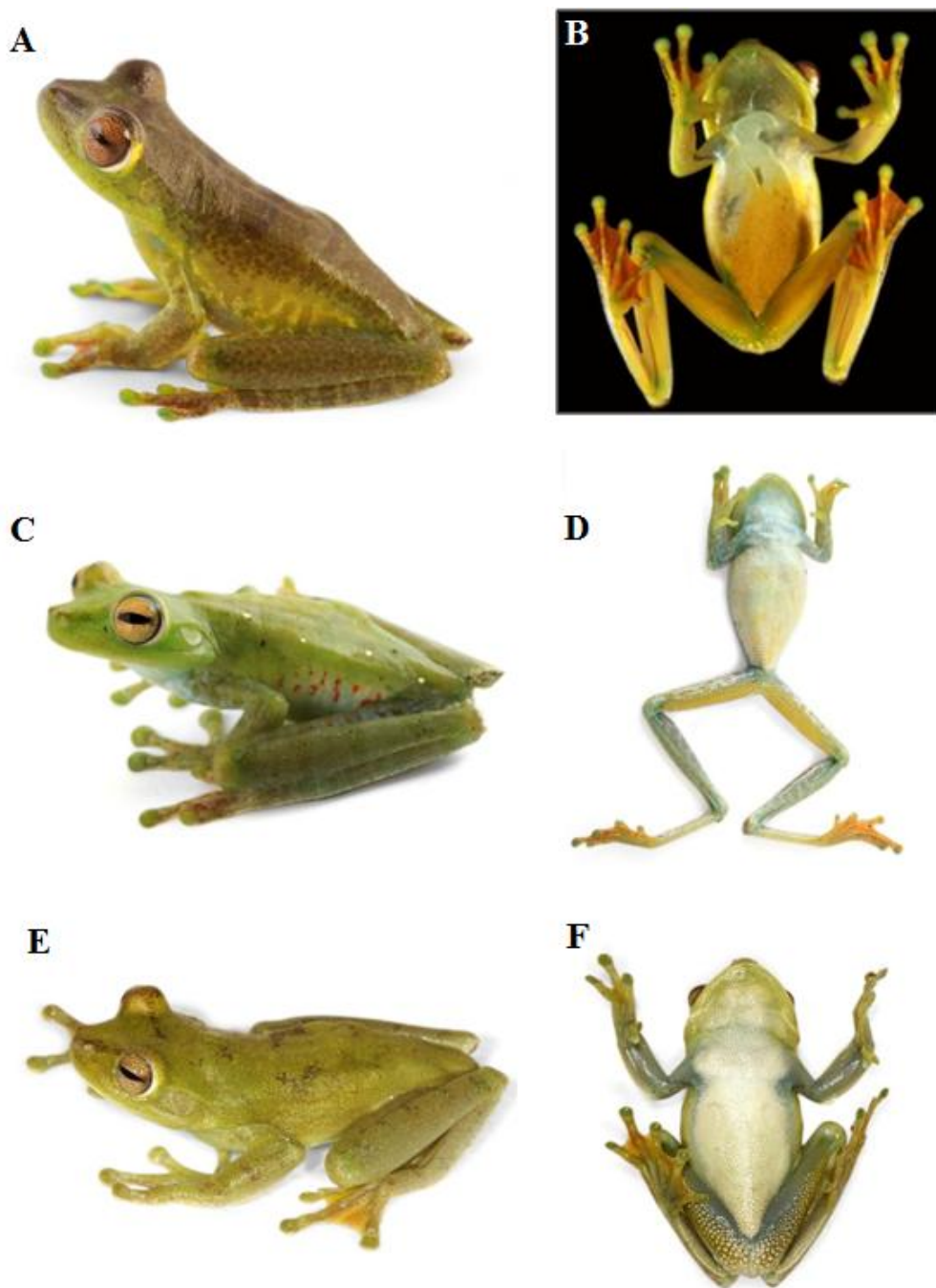


Figura 12. Vista dorso lateral y ventral de machos adultos de *Hypsiboas pellucens* de los tres clados. (A y B) clado A (QCAZ 40271, LCR= 43.06); (C y D) clado B (QCAZ 45264, LCR= 52.89) y (E y F) clado C (no colectado), Fotos: Santiago R. Ron y Morley Read.

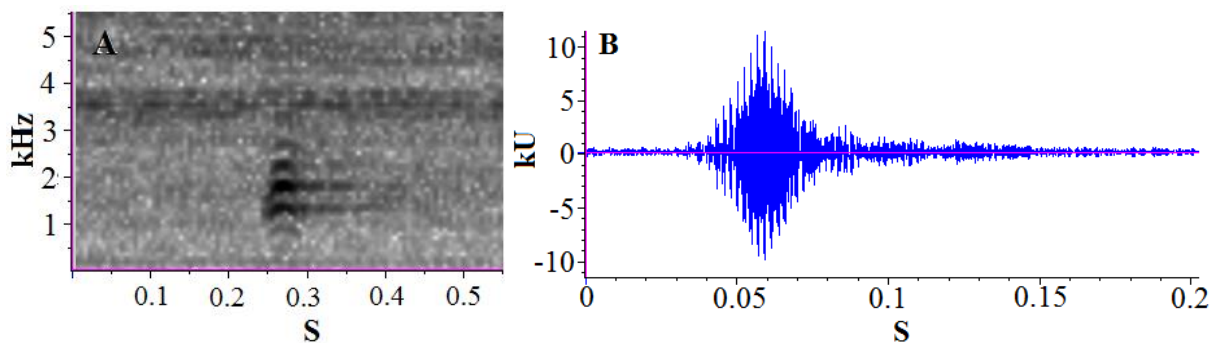
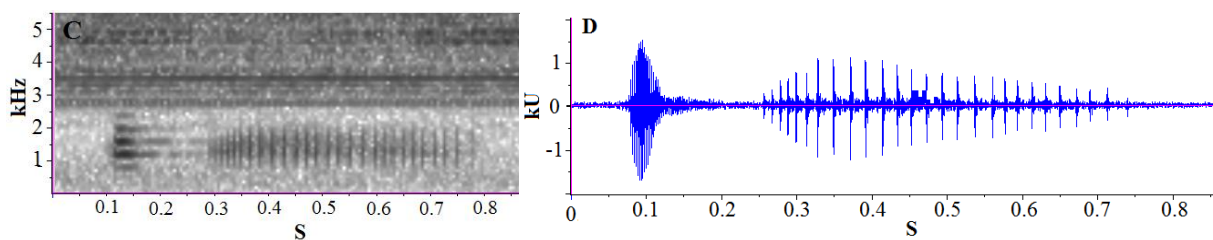
Canto 1**Canto 2**

Figura 13. Cantos de anuncio pertenecientes a la localidad de Durango-Esmeraldas (Clado A-QCAZ51870). Se muestran dos tipos de cantos: (A) y (B) Espectrograma y Oscilograma primera variación del canto. (C) y (D) Espectrograma y Oscilograma segunda variación del canto.

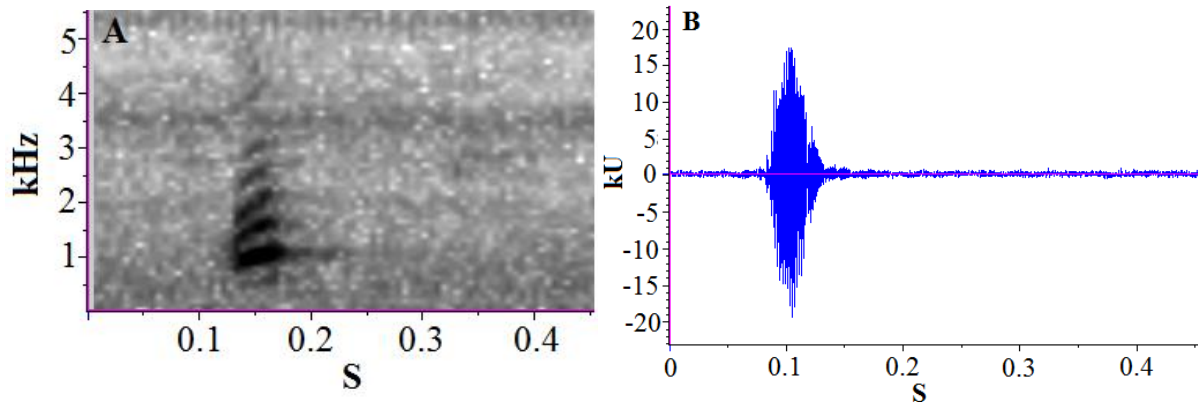
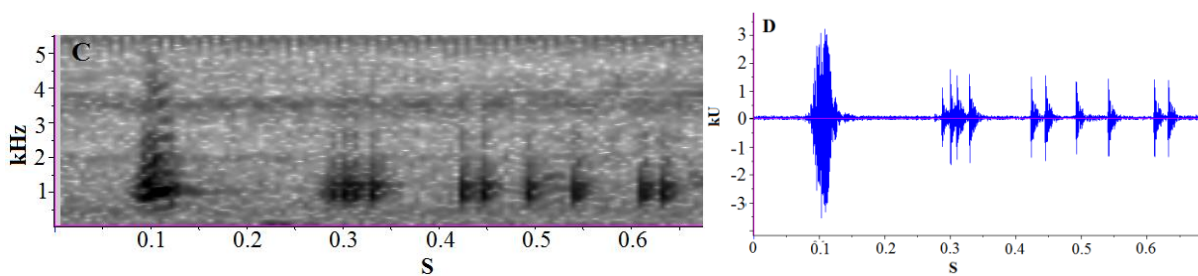
Canto 1**Canto 2**

Figura 14. Cantos de anuncio pertenecientes a la localidad de Los Bancos-Pichincha (Clado B-QCAZ52412). Se muestran dos tipos de cantos: (A) y (B) Espectrograma y Oscilograma primer canto. (C) y (D) Espectrograma y Oscilograma segundo canto.

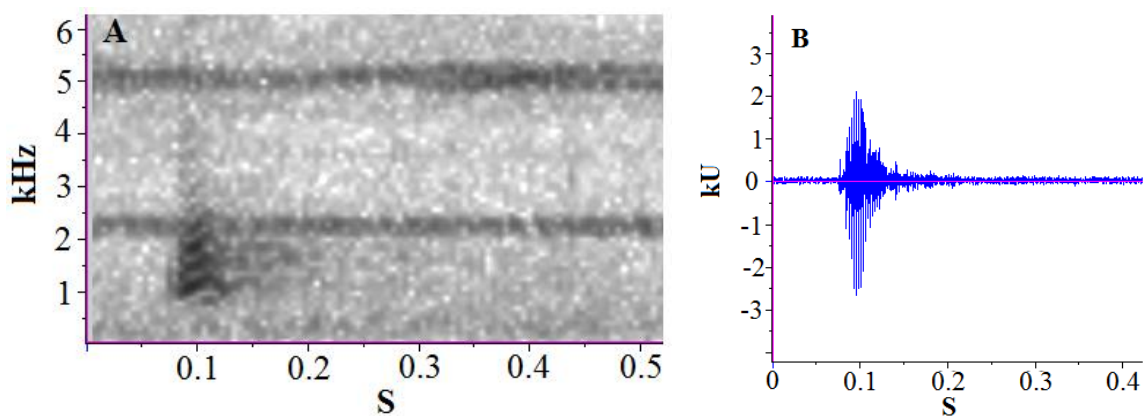
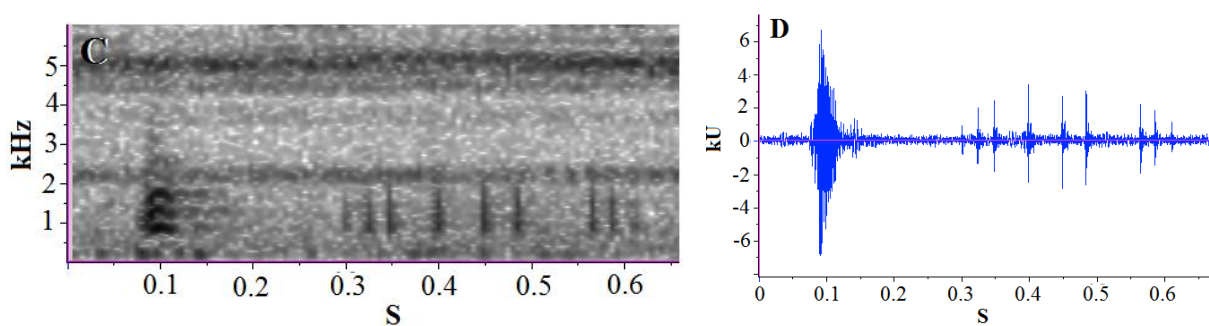
Canto 1**Canto 2**

Figura 15. Cantos de anuncio pertenecientes a la localidad de Puyango (Clado C-individuo no colectado). Se muestran dos tipos de cantos: (A) y (B) Espectrograma y Oscilograma primer canto. (C) y (D) Espectrograma y Oscilograma segundo canto.

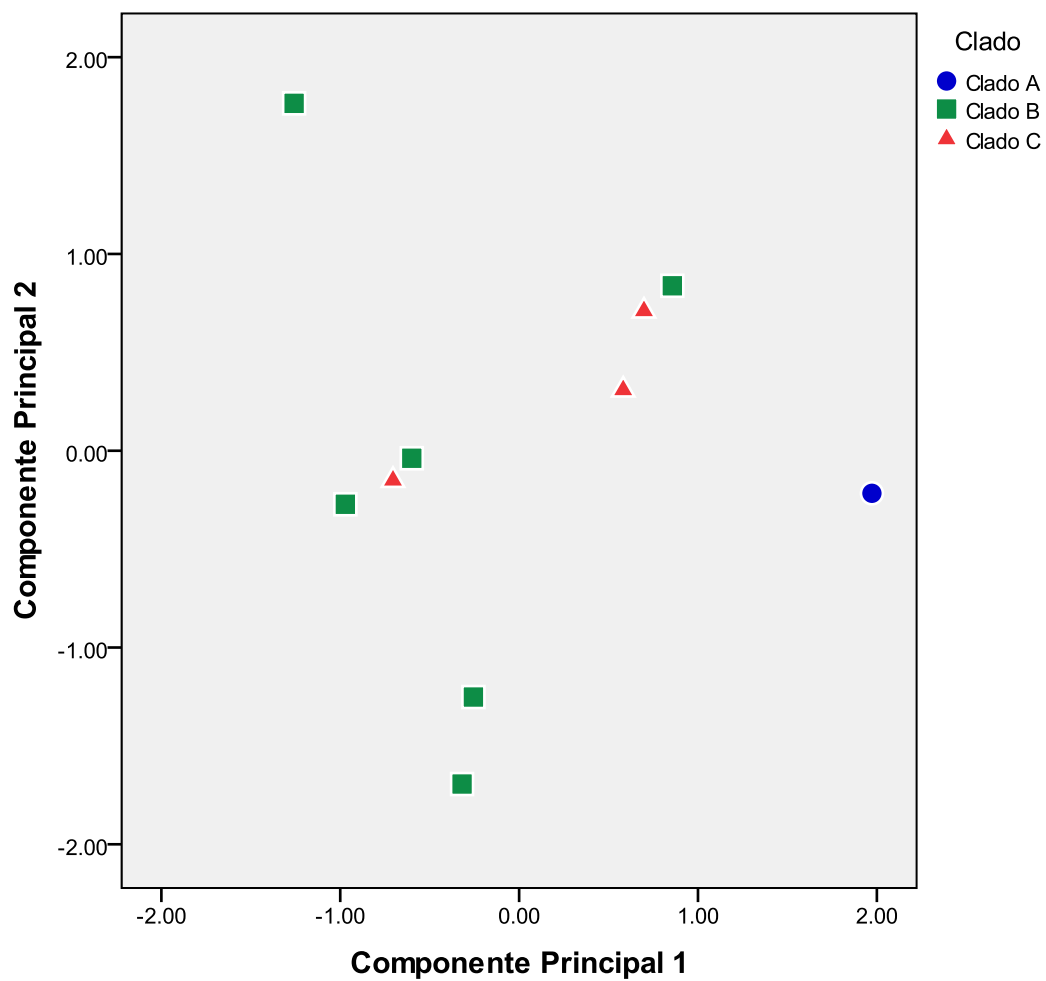


Figura 16. Proyección de las variables acústicas sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales pertenecientes a *Hypsiboas pellucens*.

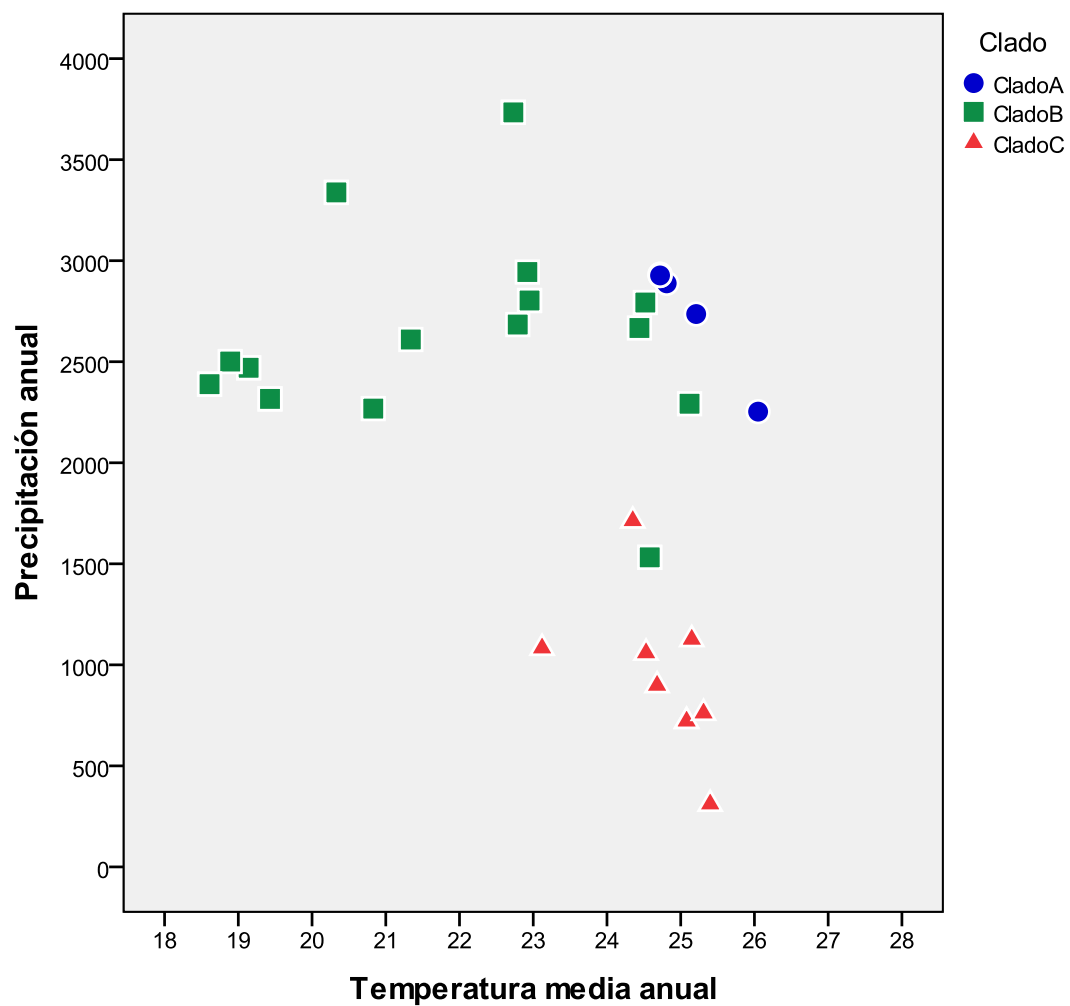


Figura 17. Proyección de las variables climáticas Temperatura Media Anual (°C) y Precipitación Anual (mm³) de individuos secuenciados de *Hypsiboas pellucens*.

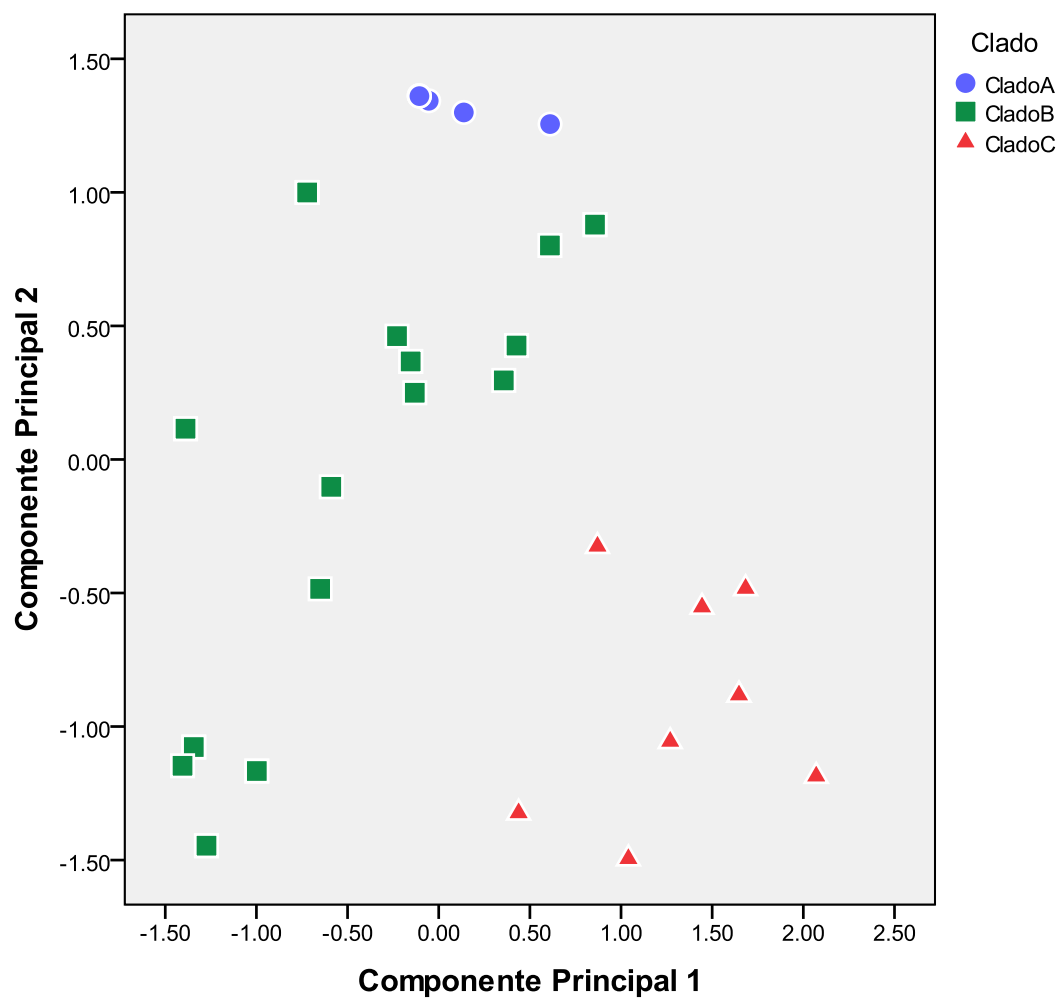


Figura 18. Proyección de las variables climáticas de individuos secuenciados de *Hypsiboas pellucens* sobre los componentes principales CP1 y CP2 de un Análisis de Componentes Principales de ocho variables ambientales.

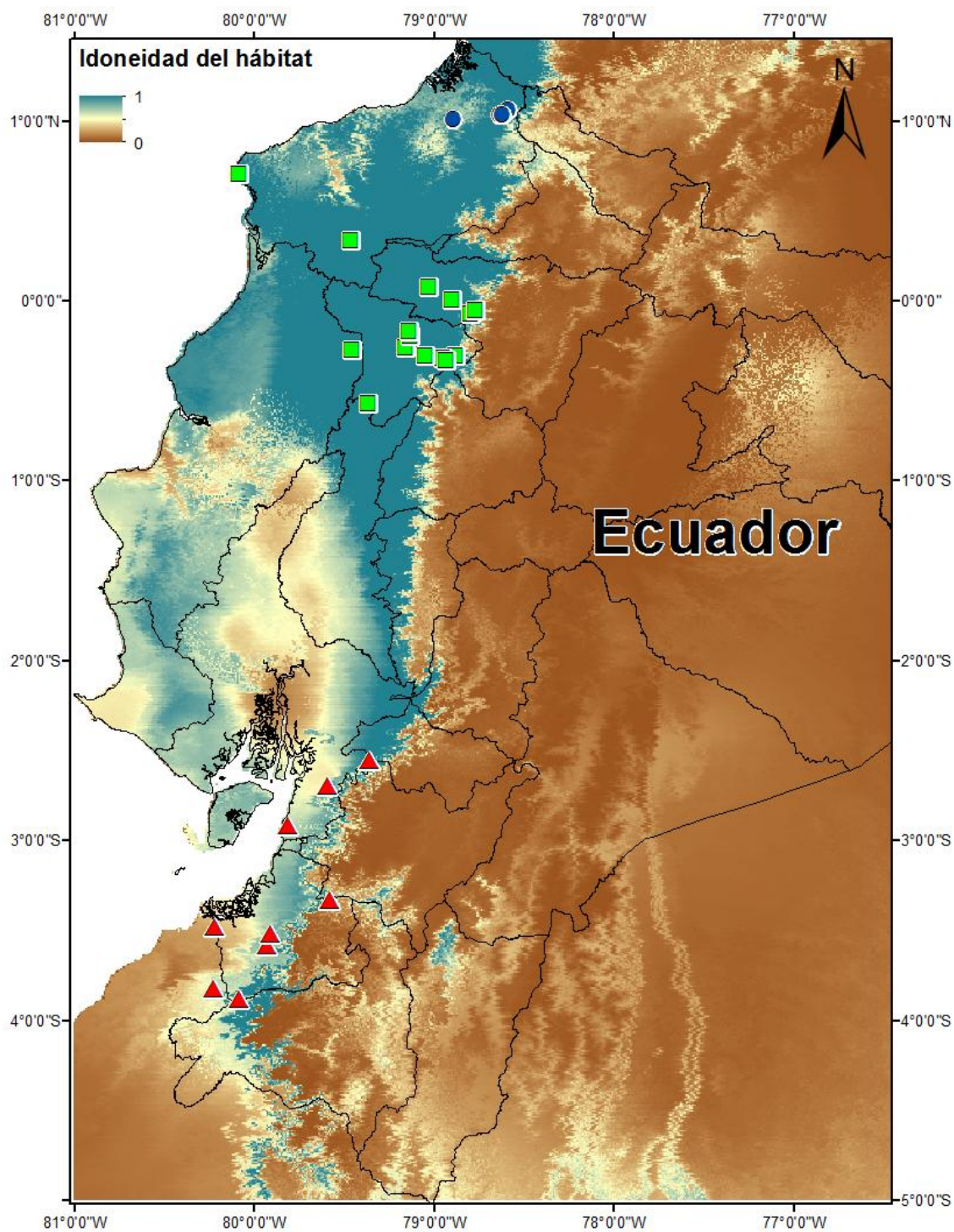


Figura 19. Modelo predictivo de nicho ecológico para los tres clados en base a condiciones actuales. Los círculos, cuadrados y triángulos representan la distribución de los individuos secuenciados. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de *H. pellucens*.

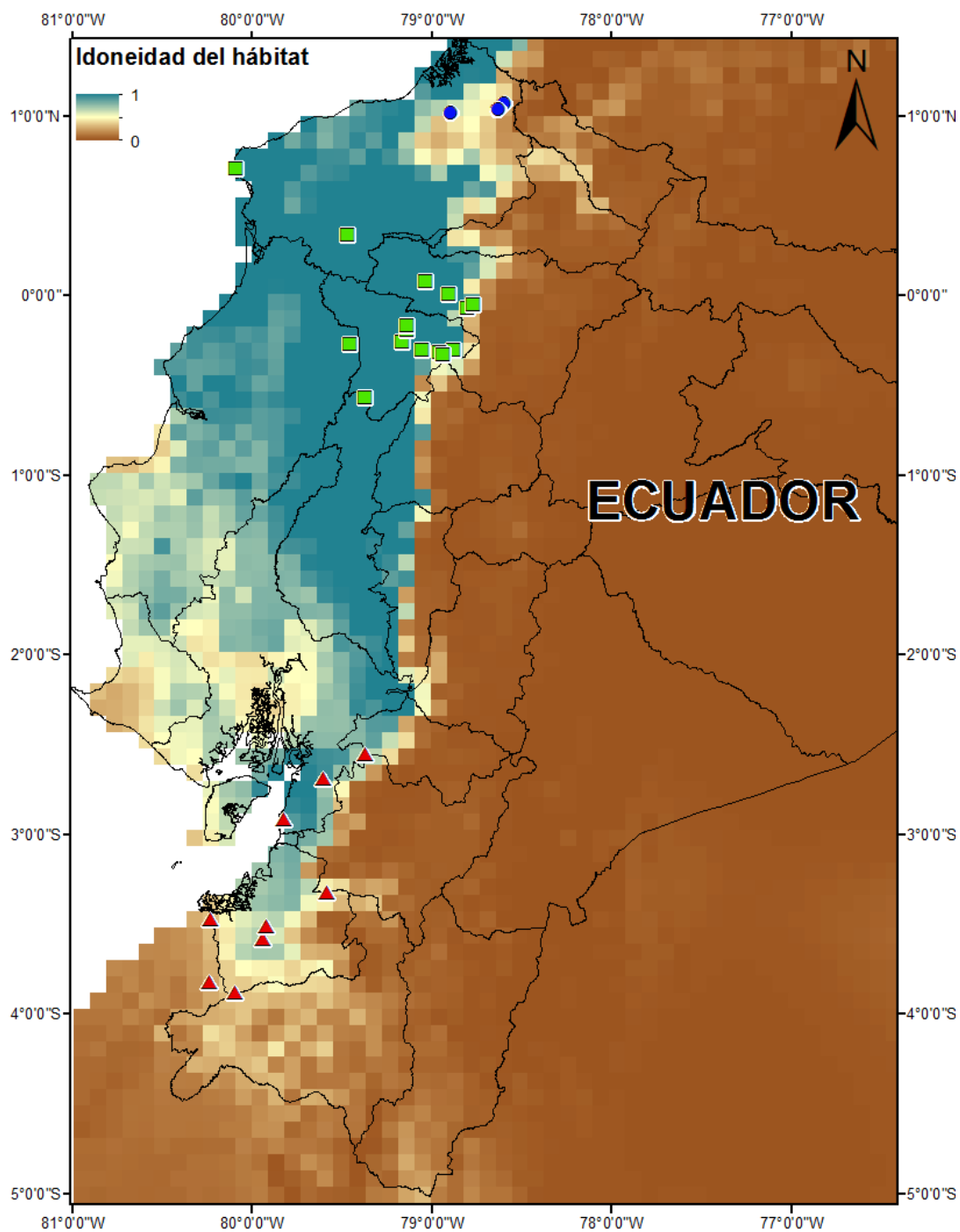


Figura 20. Modelo predictivo de nicho ecológico, para los tres clados en base a condiciones pasadas. Los círculos, cuadrados y triángulos representan la distribución de los individuos secuenciados. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado de *H. pellucens*.

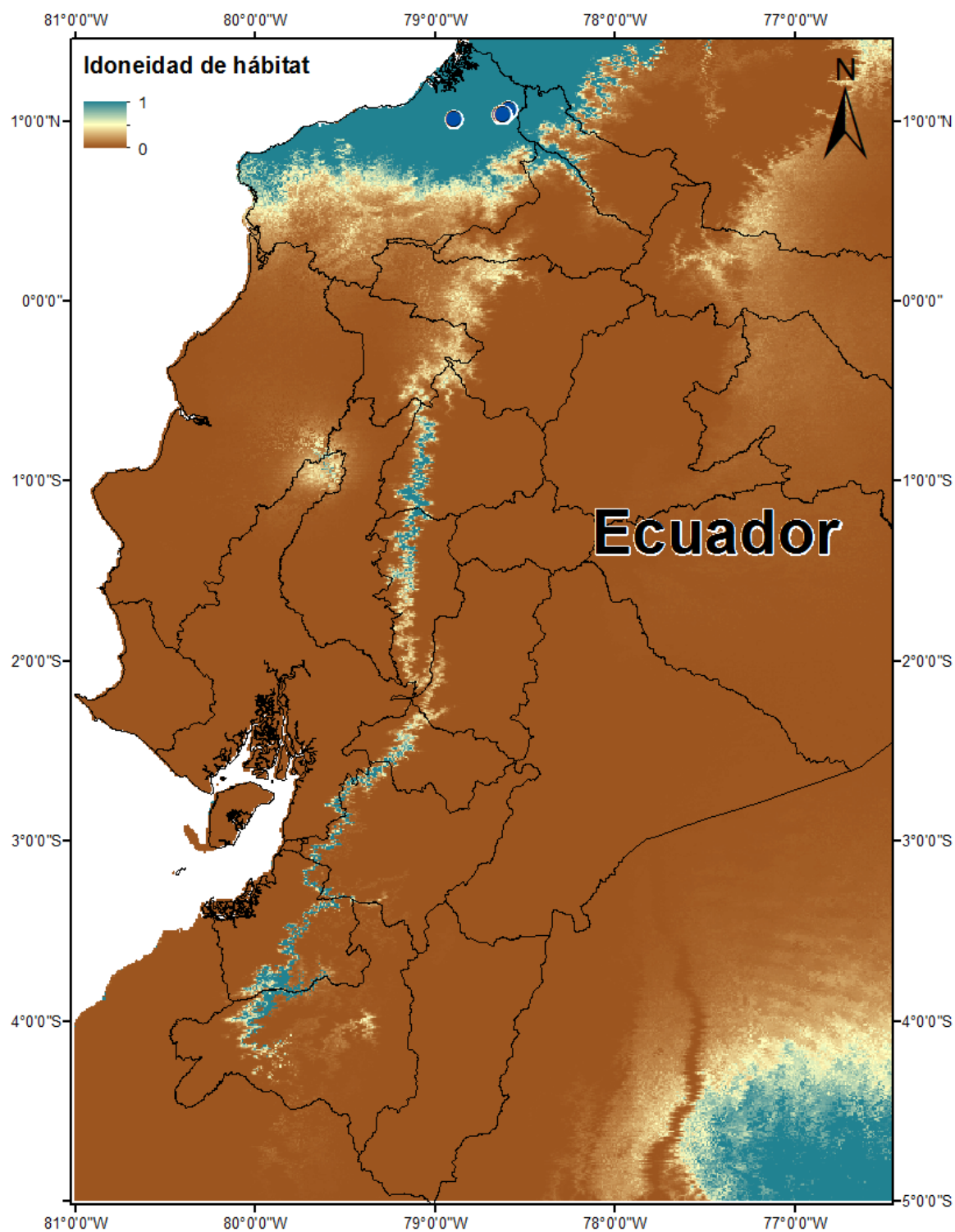


Figura 21. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado A en base a condiciones actuales. Los círculos representan la distribución de los individuos secuenciados del clado A. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado.

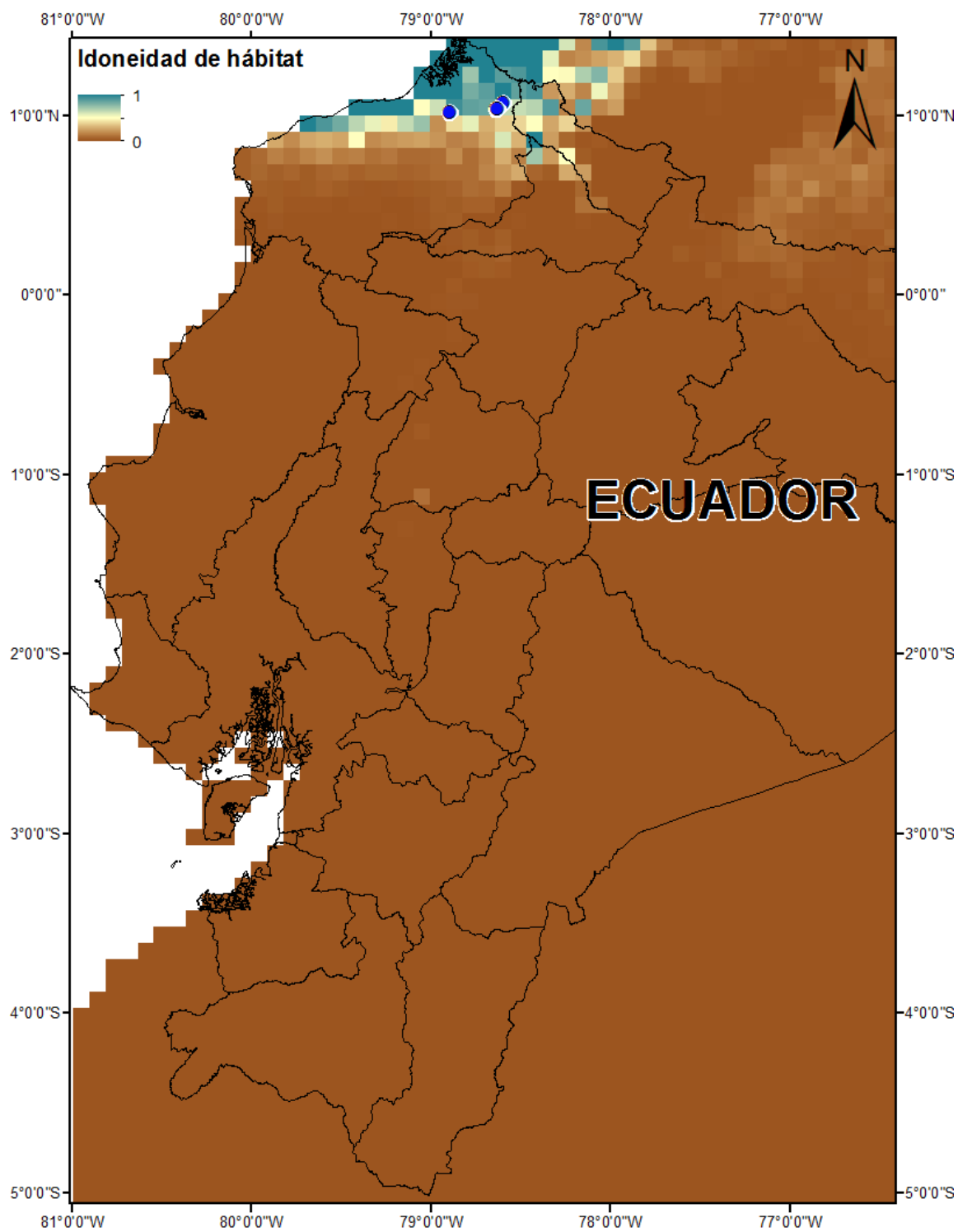


Figura 22. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado A en base a condiciones pasadas. Los círculos representan la distribución de los individuos secuenciados del clado A. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado.

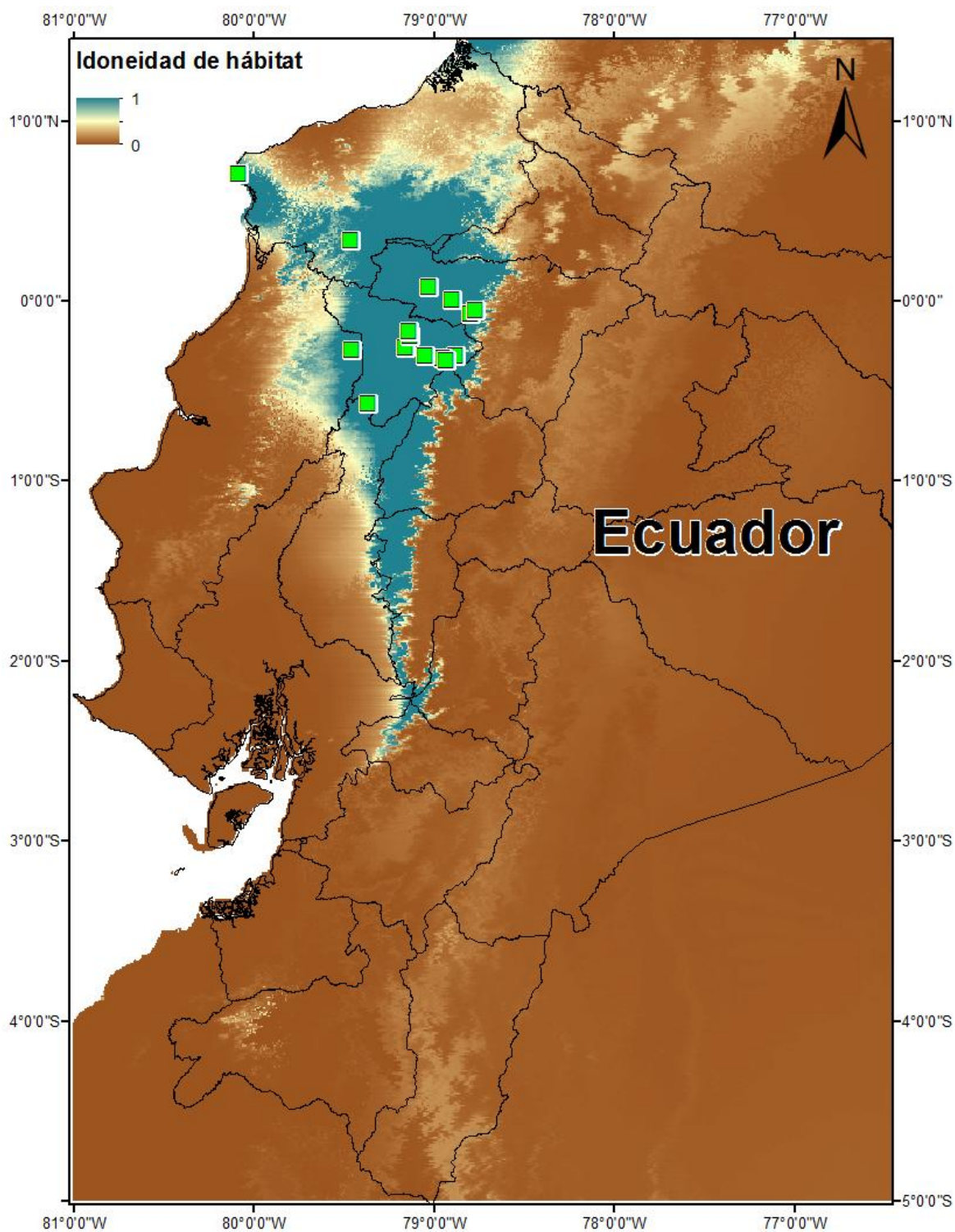


Figura 23. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado B en base a condiciones actuales. Los cuadrados representan la distribución de los individuos secuenciados del clado B. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado.

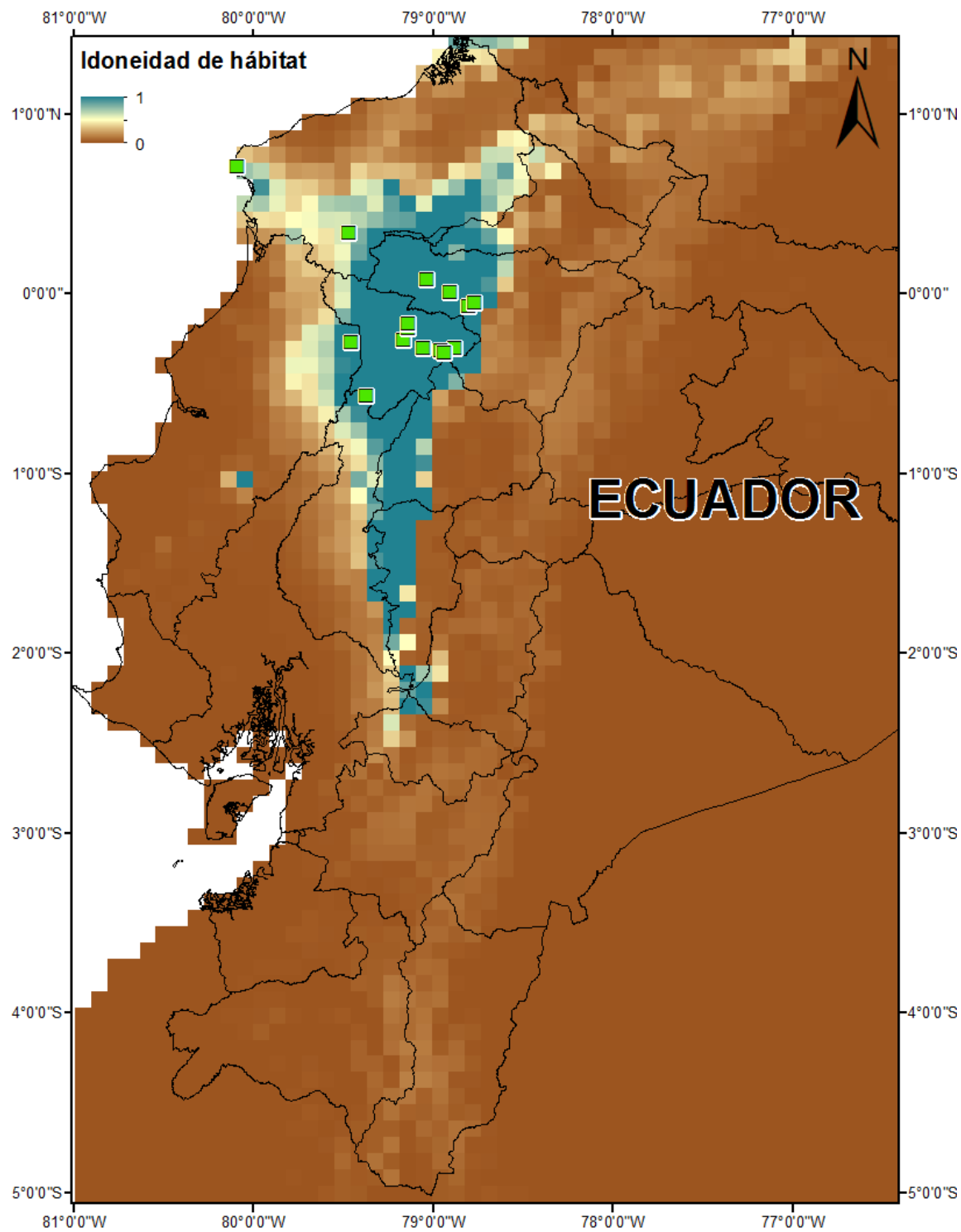


Figura 24. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado B en base a condiciones pasadas. Los cuadrados representan la distribución de los individuos secuenciados del clado B. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado.

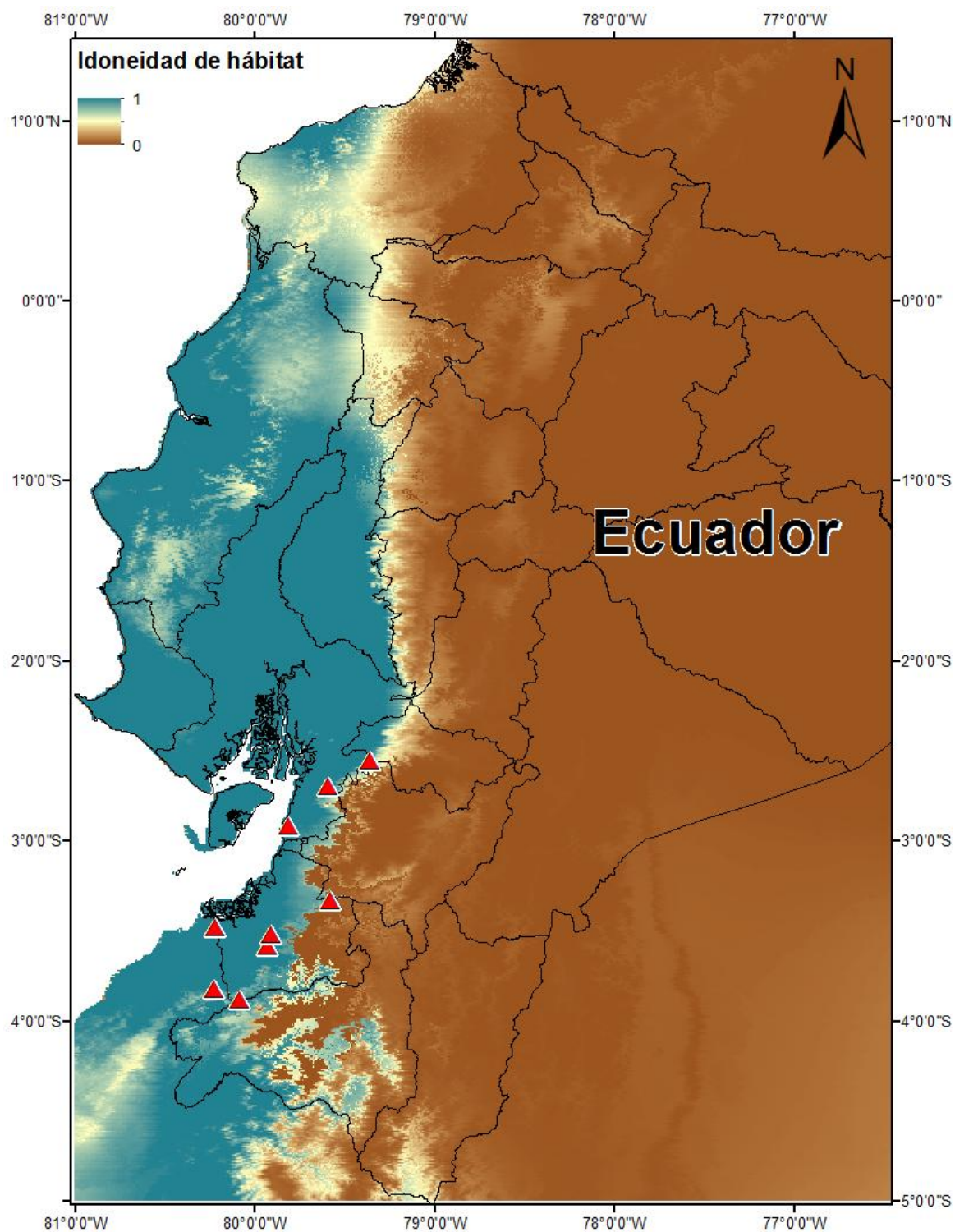


Figura 25. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado C en base a condiciones actuales. Los triángulos representan la distribución de los individuos secuenciados del clado C. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado.

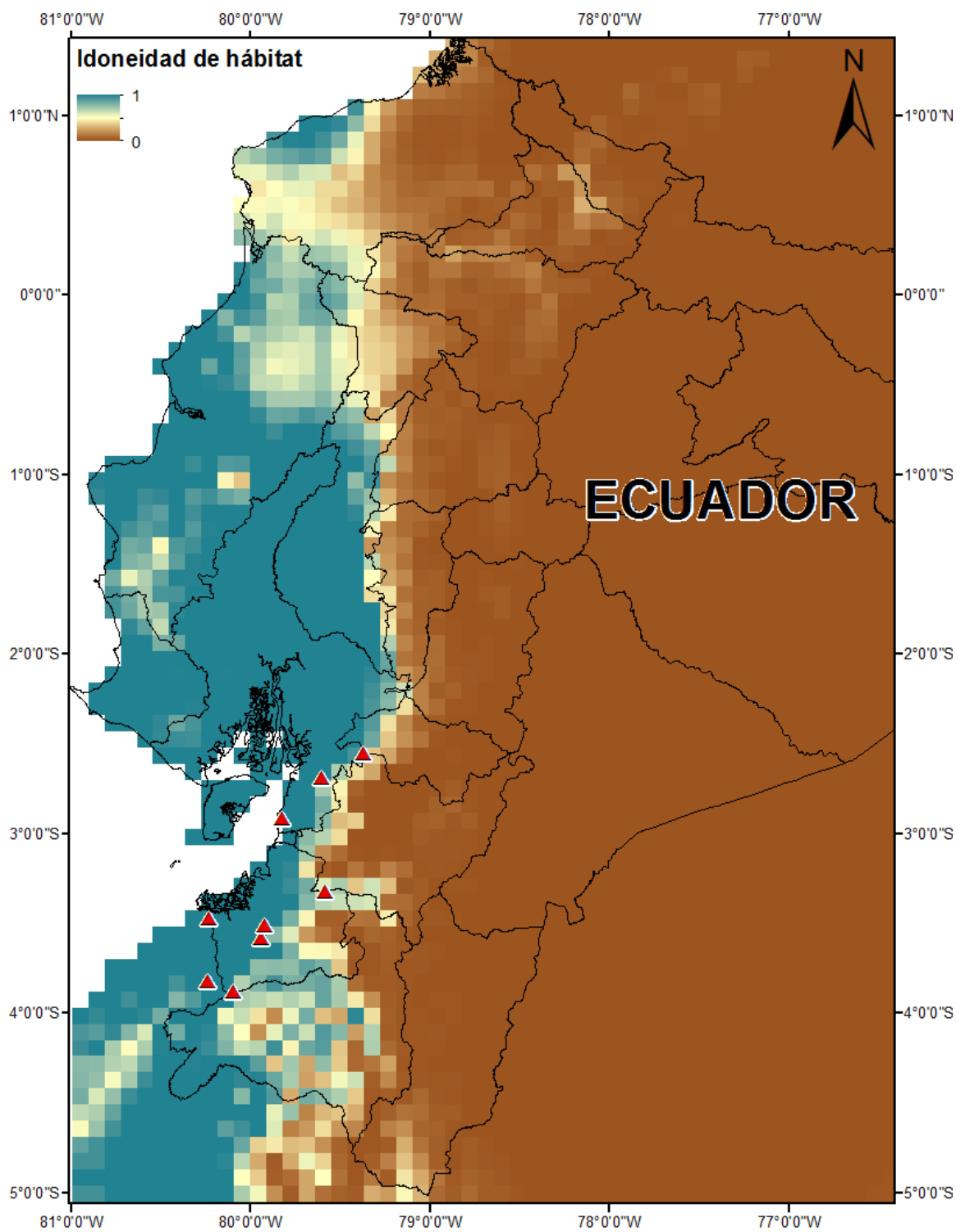


Figura 26. Modelo predictivo de nicho ecológico para el clado C en base a condiciones pasadas. Los triángulos representan la distribución de los individuos secuenciados del clado C. Se indica en azul las condiciones idóneas para la distribución de este clado.

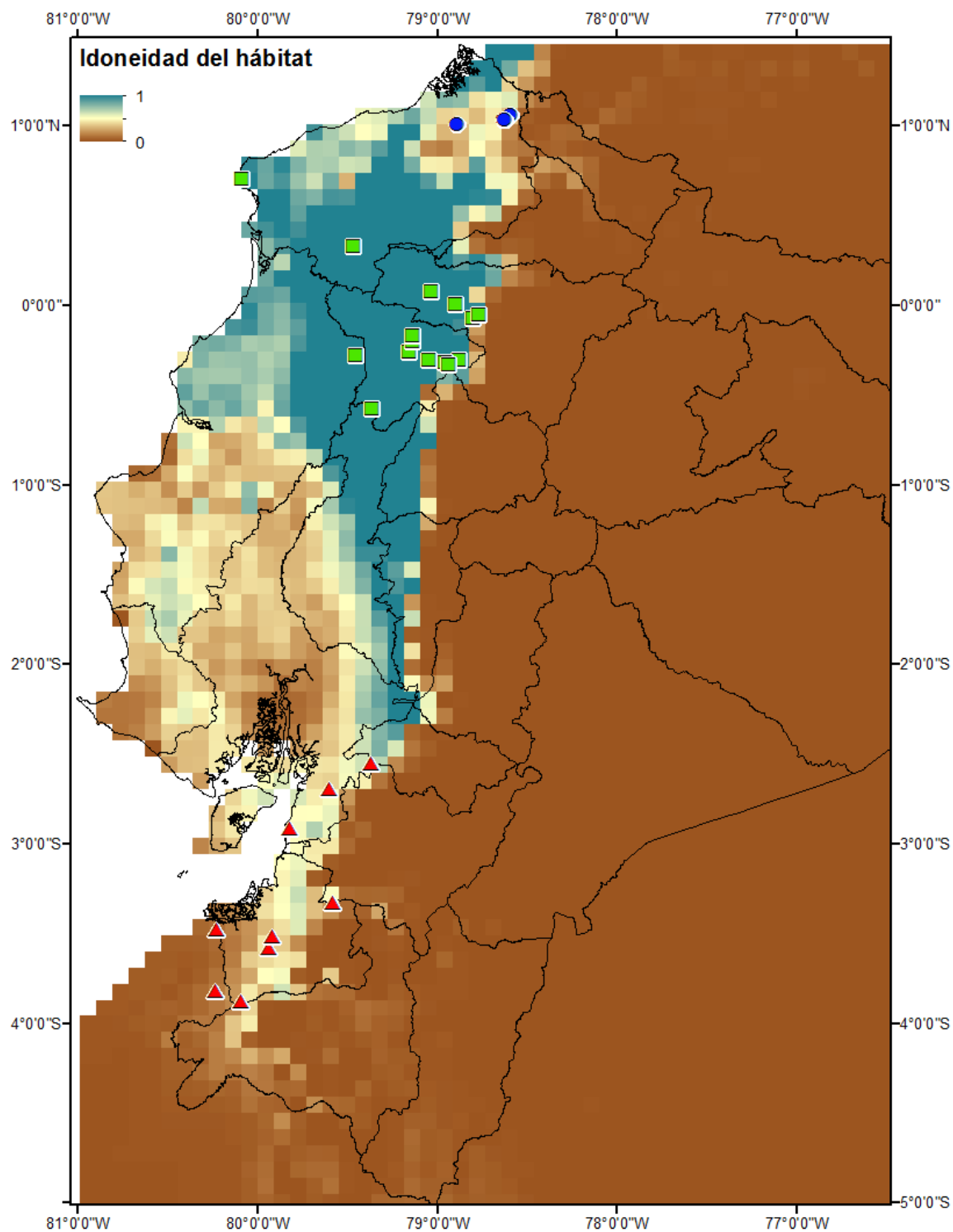


Figura 27. Mapa de estabilidad ambiental entre pasado y presente para los tres clados. Los círculos, cuadrados y triángulos representan la distribución de los individuos secuenciados. Se indica en azul lo zona de estabilidad que se ha mantenido con el paso del tiempo.

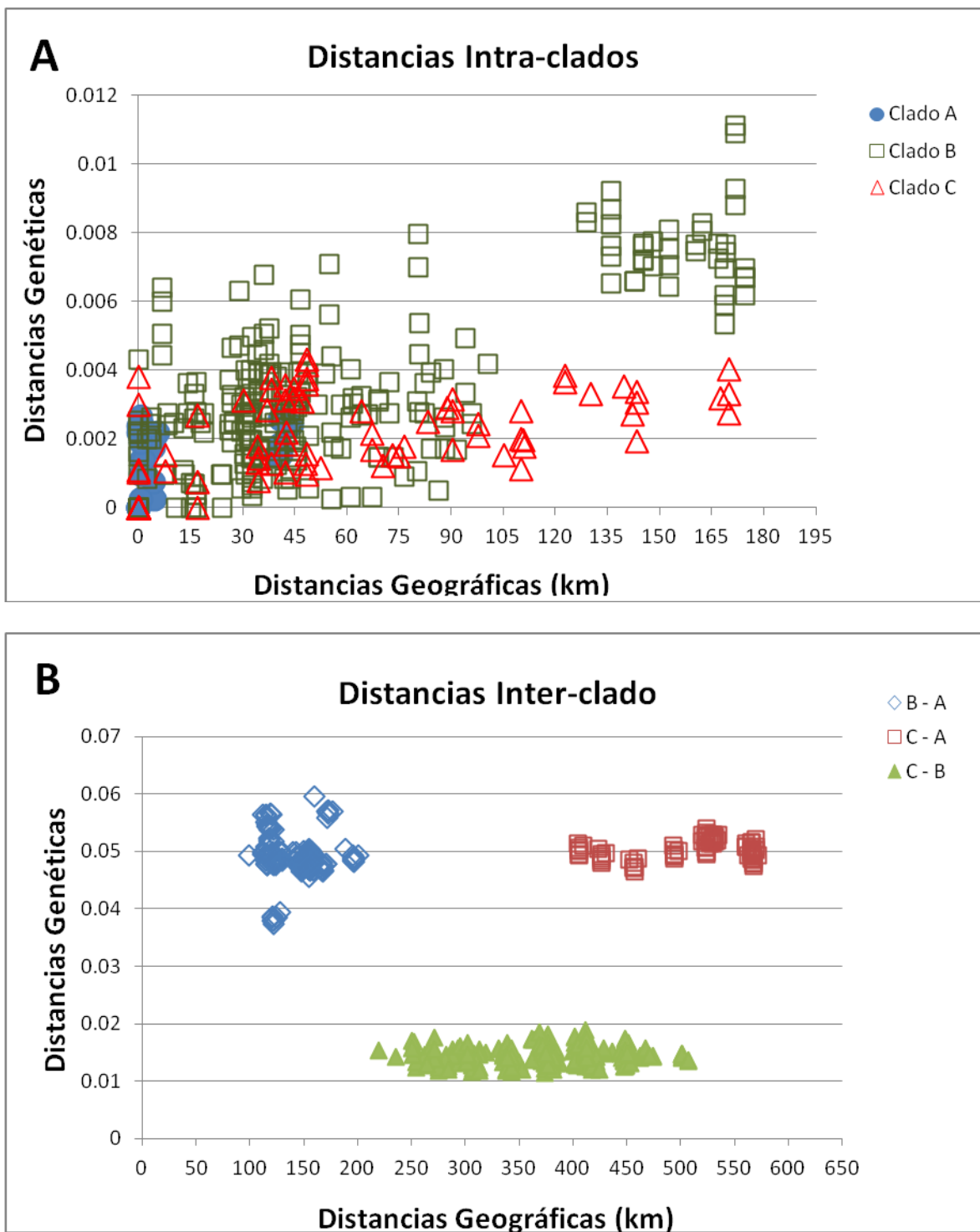


Figura 28. Cuadro de dispersión de distancias geográficas vs. distancias genéticas. (A) relación de distancias dentro de cada clado. (B) relación de distancias entre clados.

9. TABLAS

Tabla 1. Fragmentos secuenciados por cada individuo colectado.

QCAZ	Provincia	Localidad	12S	16S	ND1	POMC
QCAZ23163	Esmeraldas	Durango, vía Borbón	X	X	X	X
QCAZ35449	Pichincha	Pedro V. Maldonado	X	X	X	X
QCAZ23680	Guayas	Arenillas	X	X	X	X
QCAZ15354	Pichincha	Vía Toachi-Chiriboga	X	X	X	X
QCAZ15513	Esmeraldas	A 3 Km de Durango	X	X	X	X
QCAZ23589	Guayas	5 Km Este de Naranjal	X	X	X	X
QCAZ30594	El Oro	La Avanzada-Playón	X	X	X	X
QCAZ37254	El Oro	Bella María	X	X	X	X
QCAZ35447	Pichincha	Mindo	X	X	X	X
QCAZ35443	Pichincha	Pedro V. Maldonado	-	X	X	X
QCAZ39523	Manabí	El Carmen	X	X	X	-
QCAZ12035	Sto Domingo	Sto Domingo	X	X	X	X
QCAZ13192	Esmeraldas	Durango	X	X	X	X
QCAZ13866	Cañar	A 300 m de Manta Real	X	X	X	X
QCAZ13875	Sto Domingo	La Florida	X	X	X	X
QCAZ13889	Sto Domingo	Alluriquín - La Florida	X	X	X	X
QCAZ15355	Pichincha	Chiriboga	X	X	X	X
QCAZ19918	Sto domingo	Km4 No La Florida	X	X	X	X
QCAZ24359	Pichincha	Union del Toachi	X	X	X	X
QCAZ31266	Pichincha	El Cinto	X	X	X	X
QCAZ35448	Pichincha	Mindo	X	X	X	X
QCAZ35451	Pichincha	Pedro V. Maldonado	X	X	X	X
QCAZ37256	El Oro	Bella María	X	X	X	X
QCAZ40270	Esmeraldas	Lita	X	X	X	X
QCAZ40271	Esmeraldas	Lita	X	X	X	X
QCAZ40342	Esmeraldas	Rosa Zárate	X	X	X	X
QCAZ40678	Esmeraldas	Caimito	X	X	X	X
QCAZ40679	Esmeraldas	Caimito	X	X	X	X
QCAZ42247	Los Ríos	C. C. Río Palenque	X	X	X	X
QCAZ45317	El Oro	Pasaje Uzchurrumi	X	X	X	X
QCAZ49629	Guayas	Balao. La Soledad	X	X	X	X
QCAZ50021	Sto domingo	Hotel Tinalandia	X	X	X	X
QCAZ51345	Perú	Tumbes	X	X	X	X
QCAZ51354	Perú	Tumbes	X	X	X	X
QCAZ51355	Perú	Tumbes	X	X	X	X
QCAZ51870	Esmeraldas	Durango	X	X	X	X
QCAZ51471	Loja	Puyango	X	X	X	X
QCAZ51856	Esmeraldas	Durango	X	X	X	X
QCAZ52298	Pichincha	Otongachi	X	X	X	X
QCAZ52299	Pichincha	Otongachi	X	X	X	X

Tabla 1. Continuación.

QCAZ	Provincia	Localidad	12S	16S	ND1	POMC
QCAZ52412	Pichincha	Los Bancos	X	X	X	-
QCAZ52413	Pichincha	Los Bancos	X	X	X	-

Tabla 2. Descripción de las variables morfométricas basada en Duellman (2001).

Simbología	Variables
LRC	Longitud desde el extremo anterior del hocico hasta la cloaca
LC	Longitud de la cabeza desde el extremo anterior del hocico hasta el margen posterior del hueso escamoso
AC	Ancho de la cabeza a nivel de la articulación mandibular
DT	Diámetro del tímpano
LTI	Longitud de la tibia desde el extremo exterior de la rodilla flexionada hasta el talón
LFE	Longitud del fémur desde la cloaca hasta el extremo externo de la rodilla flexionada
LP	Longitud del pie desde el extremo proximal del tubérculo metatarsal hasta el extremo distal del Dedo IV
DO	Diámetro del ojo
TC	Tamaño del calcar

Tabla 3. Descripción de las variables temporales y espectrales obtenidas del análisis de los cantos de anuncio de *Hypsiboas pellucens*.

Simbología	Variable	unidad	Descripción
Dl	Duración de la llamada	s	Medición física del canto, tiempo desde el comienzo hasta el final del canto
Nl	Notas por llamado	U	Conteo físico de las notas del canto
Dn	Duración de la nota		Medición física de la nota, tiempo desde el comienzo hasta el final de cada nota.
Tsl	Tiempo de subida del llamado	s	Tiempo en el cual en una nota se invierte la mayor energía
Fdl	Frecuencia dominante del llamado	Hz	Medición de la intensidad de la armónica con la mayor energía del espectro del canto
Ffl	Frecuencia fundamental del llamado	Hz	Medición de la intensidad de la primera armónica del espectro del canto
Fda2	Frecuencia dominante de la segunda armónica	Hz	Medición de la intensidad de la mayor energía del espectro de la segunda armónica.
Fda3	Frecuencia dominante de la tercera armónica	Hz	Medición de la intensidad de la mayor energía del espectro de la tercera armónica.
Fda4	Frecuencia dominante de la cuarta armónica	Hz	Medición de la intensidad de la mayor energía del espectro de la cuarta armónica.
Npn	Número de pulsos por nota	U	Conteo físico de pulsos por nota
Trp	Tasa de repetición por pulsos	(pulso/s)	Número de pulsos por segundo calculado a partir del periodo de pulsos

Tabla 4. Modelos de evolución seleccionados para cada partición en los análisis filogenéticos con el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Para los genes 12S, 16S, ND1, POMC y tRNA^{Leu} y tRNA^{Ileu} El valor AICc corresponde al Criterio de Información Akaik con corrección para muestras pequeñas.

Gen	Modelo de evolución	Frecuencia			
		A	T	G	C
12S	GTR+G	0.327	0.24	0.188	0.246
16	GTR+G	0.354	0.253	0.167	0.226
ND1	TPM3uf+I	0.338	0.261	0.182	0.22
tRNA ^{Leu} y tRNA ^{Ileu}	TrN+G	0.264	0.306	0.128	0.302
POMC	TIM2+I	0.347	0.158	0.226	0.242

Tabla 5. Distancias genéticas p no corregidas del gen 12S entre los 3 clados y el grupo externo. Se muestra el promedio, la desviación estándar (\pm) y el rango para cada variable entre paréntesis.

	CLADO A	CLADO B	CLADO C	Grupo Externo
CLADO A	0.00086 \pm 0.0011 (0.0–0.00355)			
CLADO B	0.029 \pm 0.0015 (0.0263–0.0328)	0.0022 \pm 0.0015 (0.0–0.00576)		
CLADO C	0.033 \pm 0.0007 (0.0314–0.0344)	0.0097 \pm 0.0016 (0.0069–0.0137)	0.0015 \pm 0.0011 (0.0–0.00344)	
Grupo Externo	0.131 \pm 0.003 (0.127–0.138)	0.122 \pm 0.0027 (0.112–0.127)	0.126 \pm 0.0029 (0.121–0.131)	0.0673 \pm 0.04 (0.08–0.1)

Tabla 6. Medidas obtenidas de machos adultos de *Hypsiboas pellucens* en mm. Para cada variable se muestra el promedio, la desviación estándar (+/-), y el rango entre paréntesis.

LRC= Longitud rostro-cloaca, LC= Longitud de la cabeza, AC= Ancho de la cabeza, DT= Diámetro del tímpano, LP= Longitud del pie, LFE= Longitud del fémur, LTI= Longitud de la tibia, DO= Diámetro del ojo y el número de individuos de los que se obtuvo las medidas (n).

Variable	Clado A	Clado B	Clado C
	n = 62	n = 33	n = 19
LRC	43.33 ± 2.6 (43 – 43.66)	46.28 ± 3.52 (45.67 – 46.89)	46.03 ± 3.62 (45.2 – 46.86)
LC	16.69 ± 1.00 (16.56 – 16.82)	16.86 ± 1.25 (16.64 – 17.08)	16.67 ± 1.28 (16.38 – 16.96)
AC	15.63 ± 0.95 (15.51 – 15.75)	16.11 ± 1.24 (15.89 – 16.33)	16 ± 1.27 (15.71 – 16.29)
DT	2.18 ± 0.27 (2.15 – 2.21)	2.23 ± 0.28 (2.18 – 2.28)	2.33 ± 0.25 (2.27 – 2.39)
LP	17.49 ± 1.28 (17.33 – 17.65)	18.86 ± 1.62 (18.58 – 19.14)	19.37 ± 1.49 (19.03 – 19.71)
LFE	22.64 ± 1.48 (22.45 – 22.83)	23.43 ± 1.84 (23.11 – 23.75)	24.21 ± 2.1 (23.72 – 24.7)
LTI	23.85 ± 1.54 (23.66 – 24.04)	24.70 ± 1.96 (24.36 – 25.04)	25.25 ± 2.03 (24.78 – 25.72)
DO	4.98 ± 0.32 (4.94 – 5.02)	4.79 ± 0.52 (4.7 – 4.88)	4.64 ± 0.47 (4.53 – 4.75)

Tabla 7. Medidas obtenidas de hembras adultas de *Hypsiboas pellucens* en mm. Para cada variable se muestra el promedio, la desviación estándar (+/-), y el rango entre paréntesis. LRC= Longitud rostro-cloaca, LC= Longitud de la cabeza, AC= Ancho de la cabeza, DT= Diámetro del tímpano, LP= Longitud del pie, LFE= Longitud del fémur, LTI= Longitud de la tibia, DO= Diámetro del ojo y el número de individuos de los que se obtuvo las medidas (n).

Variable	Clado A	Clado B	Clado C
	n = 6	n = 9	n = 3
LRC	54.59 ± 2.89 (53.41 – 55.77)	54.78 ± 5.6 (52.91 – 56.65)	52.76 ± 3.85 (50.54 – 54.98)
LC	20.44 ± 0.79 (20.12 – 20.76)	20.18 ± 2.24 (19.43 – 20.93)	19.12 ± 1.16 (18.45 – 19.79)
AC	19.46 ± 1.17 (18.98 – 19.94)	19.04 ± 2.12 (18.33 – 19.75)	18.04 ± 0.79 (17.58 – 18.50)
DT	2.56 ± 1.16 (2.50 – 2.62)	2.82 ± 0.4 (2.69 – 2.95)	2.74 ± 0.3 (2.57 – 2.91)
LP	22.49 ± 1.16 (22.02 – 22.96)	23.54 ± 2.1 (22.84 – 24.24)	21.86 ± 1.14 (21.20 – 22.52)
LFE	29.21 ± 1.1 (28.76 – 29.66)	29.11 ± 2 (28.44 – 29.78)	28.11 ± 1.28 (27.37 – 28.85)
LTI	30.65 ± 1.09 (30.20 – 31.10)	30.81 ± 2.86 (29.86 – 31.76)	28.92 ± 1.06 (28.31 – 29.53)
DO	5.81 ± 0.38 (5.65 – 5.97)	5.61 ± 0.63 (5.40 – 5.82)	4.85 ± 0.62 (4.49 – 5.21)

Tabla 8. Resultados del análisis de la prueba de t comparando la variable longitud rostro cloacal (LRC) entre machos y hembras de los diferentes clados de *H. pellucens*. Se utilizó la transformación logarítmica. Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación de hembras. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación de machos.

	Hembras	Clado A	Clado B	Clado C
Machos				
Clado A	–		$P = 0.995$ $t = 0.006$	$P = 0.437$ $t = 0.824$
Clado B	$P = < 0.001$ $t = - 4.551$	–		$P = 0.617$ $t = 0.516$
Clado C	$P = 0.001$ $t = - 3.472$	$P = 0.803$ $t = 0.251$	–	

Tabla 9. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable morfológica en machos pertenecientes a *Hypsiboas pellucens*. Se utilizaron los residuos de los logaritmos.

Variables	Componentes	
	1	2
Longitud Rostro Cloacal	.000	.000
Largo de la Cabeza	0.864	-0.284
Ancho de la Cabeza	0.868	-0.192
Diámetro del Tímpano	0.552	-.239
Longitud de la Tibia	0.453	.788
Longitud del Fémur	0.412	.777
Largo del Pie	0.226	.624
Diámetro del Ojo	0.756	-.364
Autovalor total	2.802	1.921
% de varianza	35.030	24.012
% acumulado	35.030	59.042

Tabla 10. Resultados del análisis de la prueba de t comparando dos componentes principales entre clados (machos). Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación del CP1. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación del CP2.

CP1 CP2	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	$P = <0.001$ $t = 4.332$	$P = 0.005$ $t = 2.902$
Clado B	$P = 0.628$ $t = -0.486$	–	$P = 0.441$ $t = -0.776$
Clado C	$P = <0.001$ $t = -3.930$	$P = <0.001$ $t = -3.432$	–

Tabla 11. Resultados del análisis de la prueba de t con la variable ancho de la cabeza (AC) y largo de la cabeza (LC) entre los diferentes clados (machos). Se utilizaron los residuales entre la LRC y las 8 variables morfométricas de los clados. Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación de la variable LFE. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación de la variable LP.

AC \ LC	AC	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A		–	$P = 0.010$ $t = 2.614$	$P = 0.011$ $t = 2.590$
Clado B	$P = <0.001$ $t = 4.579$		–	$P = 0.775$ $t = 0.288$
Clado C	$P = <0.001$ $t = 4.656$		$P = 0.464$ $t = 0.738$	–

Tabla 12. Resultados del análisis de la prueba de t con la variable longitud de la tibia (LTI) y longitud del fémur (LFE) entre los diferentes clados (machos). Se utilizaron los residuales entre la LRC y las 8 variables morfométricas de los clados. Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación de la variable LTI. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación de la variable LFE.

LTI \ LFE	LTI	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	$P = 0.034$ $t = 2.154$	$P = 0.519$ $t = -0.647$	
Clado B	$P = 0.073$ $t = 1.815$	–	$P = 0.023$ $t = -2.435$	
Clado C	$P = 0.123$ $t = -1.56$	$P = 0.011$ $t = -2.627$	–	

Tabla 13. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable morfológica en hembras pertenecientes a *Hypsiboas pellucens*. Se utilizaron los residuos de los logaritmos.

Variables	Componentes	
	1	2
Longitud rostro cloacal	.000	0.000
Largo de la cabeza	0.757	-0.019
Ancho de la cabeza	0.423	-0.707
Diámetro del tímpano	0.068	0.845
Longitud de la tibia	0.830	0.141
Longitud del fémur	0.704	0.077
Largo del pie	0.686	0.549
Diámetro del ojo	0.515	-0.568
Autovalor total	2.676	1.866
% de varianza	35.454	23.324
% acumulado	35.454	56.778

Tabla 14. Resultados del análisis de la prueba de t comparando dos componentes principales entre clados (hembras). Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación del CP1. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación del CP2.

CP1 \ CP2	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	$P = 0.790$ $t = 0.038$	$P = 0.116$ $t = 1.794$
Clado B	$P = 0.003$ $t = -3.584$	–	$P = 0.101$ $t = 1.809$
Clado C	$P = 0.003$ $t = 0.323$	$P = 0.672$ $t = -0.436$	–

Tabla 15. Resultados del análisis de la prueba de t con la variable longitud de la tibia (LTI) y largo de la cabeza (LC) entre los diferentes clados (hembras). Se utilizaron los residuales entre la LRC y las 8 variables morfométricas de los clados. Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación de la variable LTI. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación de la variable LC.

LTI \ LC	LTI	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	$P = 0.898$ $t = -0.13$	$P = 0.296$ $t = 1.13$	
Clado B	$P = 0.326$ $t = 1.021$	–	$P = 0.279$ $t = 1.145$	
Clado C	$P = 0.094$ $t = 1.939$	$P = 0.514$ $t = 0.677$	–	

Tabla 16. Resultados del análisis de la prueba de t con la variable diámetro del tímpano (DT) (hembras). Se utilizaron el residual entre la LRC y diámetro del tímpano.

DT \	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	–	–
Clado B	$P = 0.011$ $t = -2.955$	–	–
Clado C	$P = 0.020$ $t = -3.007$	$P = 0.618$ $t = -0.515$	–

Tabla 17. Medias de variables bioacústicas para el primer tipo de canto para los tres clados. Para cada variable se muestra el promedio, la desviación estándar (+/-), el rango entre paréntesis y n hace referencia al número de individuos grabados dentro de cada clado.

Variable	Clado A n = 1	Clado B n = 6	Clado C n = 3
Duración de la llamada (s)	0.0816 ± 0.006 (0.079 – 0.084)	0.345 ± 0.178 (0.03 – 0.66)	0.119 ± 0.689 (0.093 – 0.145)
Frecuencia dominante (Hz)	1649.46 ± 356.62 (1489.98 – 1808.94)	1134.84 ± 218.78 (1096.17 – 1173.51)	1334.52 ± 269.38 (1232.7 – 1436.34)
Frecuencia fundamental (Hz)	861.34 ± 21.55 (851.7 – 870.98)	567.06 ± 134.94 (543.21 – 590.91)	615.1 ± 121.3 (569.25 – 660.95)
Duración de la nota (s)	0.0816 ± 0.006 (0.079 – 0.084)	0.0565 ± 0.1823 (0.562 – 0.568)	0.042 ± 0.00844 (0.039 – 0.045)
Tasa de repetición de pulsos (pulsos/s)	12.31 ± 0.91 (11.92 – 12.72)	19 ± 3.95 (18.3 – 19.7)	25.12 ± 4.86 (23.28 – 26.96)
Tiempo de subida del llamado (s)	0.018 ± 0.0052 (0.016 – 0.02)	0.022 ± 0.0032 (0.0214 – 0.0226)	0.016 ± 0.0042 (0.014 – 0.018)
Frec. Dominante de la segunda armónica (Hz)	1296.32 ± 38.54 (1279.08 – 1313.56)	936.12 ± 112.87 (916.17 – 956.07)	996.52 ± 109.83 (955.01 – 1038.03)
Frec. Dominante de la tercera armónica (Hz)	1718.36 ± 76.75 (1684.04 – 1752.68)	1231.34 ± 173.22 (1200.72 – 1261.96)	1392.03 ± 133.58 (1341.54 – 1442.52)
Frec. Dominante de la cuarta armónica (Hz)	2166.26 ± 70.79 (2134.6 – 2197.92)	1547.89 ± 203.45 (1511.93 – 1583.85)	1751.91 ± 127.614 (1703.68 – 1800.14)

Tabla 18. Medias de variables para la primera y segunda nota del segundo tipo de canto para los tres clados. Para cada variable se muestra el promedio, la desviación estándar (+/-), el rango entre paréntesis y n hace referencia al número de individuos grabados dentro de cada clado.

No. de Nota	Variable	Clado A	Clado B	Clado C
		n = 1	n = 6	n = 3
-	Duración de la llamada (s)	0.682	0.803 ± 0.111 (0.779 – 0.827)	0.657 ± 0.026 (0.647 – 0.0667)
1ra.	Número de pulsos por nota (U)1	1	1	1
2da.	Número de pulsos por nota (U)2	27	13.19 ± 3.143 (12.29 – 14.09)	12.325± 2.285 (11.18 – 13.46)
1ra.	Frecuencia dominante (Hz)1	1184.3	1259.17 ± 230.57 (1210.01 – 1308.33)	1335.23 ± 78.837 (1305.44 – 1365.02)
2da.	Frecuencia dominante (Hz)2	1270.5	1570.99± 1655.506 (1093.09 – 2048.89)	1026.46 ± 260.76 (896.09 – 1156.83)
1ra.	Frecuencia fundamental (Hz)	796.7	529.42 ± 149.31 (497.59 – 561.25)	607.31 ± 73.56 (579.51 – 635.11)
1ra.	Duración de la nota (s)1	0.087	0.055 ± 0.0095 (0.053 – 0.057)	0.037 ± 0.0075 (0.034 – 0.04)
2da.	Duración de la nota (s)2	0.489	0.556 ± 0.3872 (0.446 – 0.666)	0.87 ± 0.99 (0.38 – 1.36)
1ra.	Tasa de repetición de pulsos (pulsos/s)1	11.49	18.99 ± 4.12 (18.12 – 19.86)	19.81 ± 13.56 (14.69 – 24.93)
2da.	Tasa de repetición de pulsos (pulsos/s)2	55.21	33.63 ± 14.2 (29.54- 37.72)	28.34 ± 9.85 (23.42 – 33.26)

Tabla 18. Continuación.

No. de Nota	Variable	Clado A	Clado B	Clado C
		n = 1	n = 6	n = 3
1ra.	Tiempo de subida del llamado (s)1	0.021	0.023 ± 0.0046 (0.022 – 0.024)	0.013 ± 0.0028 (0.012 – 0.014)
2da.	Tiempo de subida del llamado (s)2	0.259	2.877 ± 9.315 (0.187 – 5.567)	0.14 ± 0.0728 (0.104 – 0.176)
1ra.	Frec. Dominante de la segunda armónica (Hz)	1184.3	952.64 ± 206.99 (908.51 – 996.77)	975.38 ± 44.27 (958.65 – 992.11)
1ra.	Frec. Dominante de la tercera armónica (Hz)	1571.9	1270.74 ± 300.33 (1206.71 – 1334.77)	1320.27 ± 93.4 (1284.97 – 1355.57)
1ra.	Frec. Dominante de la cuarta armónica (Hz)	1959.5	1634.69 ± 299.28 (1570.89 – 1698.49)	1665.76 ± 190.94 (1593.6- 1737.92)

Tabla 19. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable bioacústica.

Variables Bioacústicas	Componente	
	1	2
Duración del canto	.009	-.828
Frecuencia dominante	.748	.351
Frecuencia fundamental	.791	.468
Tiempo de subida	-.533	-.326
Segunda armónica	.889	.321
Tercera armónica	.945	-.041
Cuarta armónica	.882	-.248
Tasa de repetición de pulsos	.015	.746
Autovalor total	4.54	3.0
% de varianza	41.27	27.34
% acumulado	41.27	68.61

Tabla 20. Resultados del análisis de la prueba de t comparando dos variables ambientales, Temperatura media anual (BIO1) y Precipitación anual (BIO12). Los valores sobre la diagonal corresponden a la variable BIO12. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación de la variable BIO1.

BIO12 \ BIO1	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	$P = 0.615$ $t = 0.509$	$P = <0.001$ $t = 11.062$
Clado B	$P = 0.001$ $t = 3.86$	–	$P = <0.001$ $t = 8.109$
Clado C	$P = 0.444$ $t = 0.788$	$P = <0.001$ $t = -4.011$	–

Tabla 21. Resultados del análisis de Componentes Principales (ACP) que indica el porcentaje aportado por cada variable ambiental en individuos secuenciados pertenecientes a *Hypsiboas pellucens*.

VARIABLE CLIMÁTICA	COMPONENTE	
	1	2
Temperatura media anual	0.847	0.499
Tasa media diaria	0.008	-0.646
Temperatura estacional	0.777	-0.175
Máxima temperatura del mes más caliente.	0.898	0.330
Temperatura mínima del mes más frío	0.742	0.658
Precipitación anual	-0.768	0.572
Precipitación del trimestre más caliente	-0.639	0.399
Precipitación del trimestre más frío	-0.623	0.597
Autovalor total	4.06	2.08
% de varianza	50.8	26.02
% acumulado	50.8	76.82

Tabla 22. Resultados del análisis de la prueba de t comparando dos componentes principales de las variables ambientales entre clados. Los valores sobre la diagonal corresponden a la comparación del CP2. Los valores bajo la diagonal corresponden a la comparación del CP1.

CP2 \ CP1	Clado A	Clado B	Clado C
Clado A	–	$P = <0.001$ $t = 4.147$	$P = <0.001$ $t = 14.763$
Clado B	$P = 0.061$ $t = 1.955$	–	$P = 0.008$ $t = 2.820$
Clado C	$P = <0.001$ $t = -6.255$	$P = <0.001$ $t = -6.869$	–

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN usando Tiocinato de Guanadina.**MÉTODO****Lisis de células y tratamiento con RNAsa**

1. Colocar el stock de la Solución de lisis de células dentro de una incubadora a 55°C.
2. Colocar 10mg de tejido en un tubo de 1.5ml que contenga 300ul de la Solución de lisis de células. Macere el tejido lo mejor posible.
3. Añadir 2-5ul de Proitenasa K (20mg/ml). Mezcle con un vórtice rápido. Incube de 3-6 horas (o toda la noche si es necesario) a 55°C.
4. ES IMPORTANTE QUE LAS MUESTRAS SEAN AGITADAS A TRAVÉS DEL PROCESO DE LISIS. Se recomienda mezclar las muestras con un vórtice por lo menos cada 30 minutos.
5. Homogenice con un vórtice suave
6. Enfríe las muestras a temperatura ambiente

Precipitación de proteínas.

Cuando comience esta paso coloque suficiente Isopropanol al 100% dentro de una congeladora a -20°C para 300ul de reacción por muestra.

1. Añada 100ul de la Solución de Precipitación de Proteínas a la mezcla de las células lisadas. Realice un vórtice vigorosamente para mezclar el contenido (10-20 segundos).

2. Centrifuge a máxima velocidad (13.000rpm) por 5 minutos. Repita si el pellet no está ajustado.
3. Traspase el sobrenadante (el cual contiene el ADN) en un tubo nuevo de 1.5ml. (para este paso usted va a mantener el sobrenadante y descartar el pellet de proteínas el cual debe estar solidificado en el fondo del tubo).

Precipitación de l ADN

1. Añada 300ul de isopropanol al 100% frío (Usted debió haberlo enfriado a -20°C). Mezcle invirtiendo suavemente el tubo 50 veces.
2. Centrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos.
3. Vierta el sobrenadante cuidadosamente dejando el pelet atrás (esta vez usted va descartar el líquido y conservar el pelet que contiene el ADN).
4. Añada 300ul de etanol al 70% e invierta el tubo varias veces para lavar el pelet.
5. Centrifugue a 13.000rpm por 5 minutos. Descarte el sobrenadante.
6. Deje el tubo con la tapa abierta por varias horas (o durante toda la noche si es necesario).

Hidratación del ADN y Almacenamiento

1. Añada de 50-200ul de 10mM Tris-Cl, pH 8.0. Entre más solución se añada más diluida estará la muestra. Golpee suavemente la base del tubo para resuspender el ADN. Puede tomar varias horas para que el ADN completamente se resuspenda.
2. Almacene para un periodo prolongado a -20°C o a -80°C, o por lo contrario a 4°C.

Anexo 2. Regiones de ADN y cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Cebadores	Secuencias (5' - 3')	Fuente	Dirección
12S Mitocondrial	t-Phe-frog	ATAGCRCTGAARAYGCTRAGATG	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Derecha
	t-Val-frog	TGTAAGCGARAGGCTTTKGTAAAGCT	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Reversa
	MVZ59	ATAGCACTGAAAAYGCTDAGATG	Graybeal (1997)	Derecha
	tRNAval	GGTGTAAGCGAGAGGCTT	Goebel <i>et al.</i> (1999)	Reversa
16S Mitocondrial	16SC	TATGGCCTAAAAGCTGCCAC	Darst y Cannatella (2004)	Derecha
	16Sbr-H	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Palumbi <i>et al.</i> (1991)	Reversa
	16SC-16L	GTRGGCCTAAAAGCAGCCAC	Pauly <i>et al.</i> (2004)	Derecha
ND1 Mitocondrial	WL384	GAGATWGTGGTGWCAACTGCTCG	Moen and Wiens, 2008	Derecha
	WL379	GCAATAATYATYTGAACMCC	Moen and Wiens, 2008	Reversa
	16S_frog	TTACCCTRGGGATAACAGCGCAA	Wiens <i>et al.</i> , 2005	Derecha
	tMet_frog	TTGGGGTATGGGCCCAAAGCT	Wiens <i>et al.</i> , 2005	Reversa
Nuclear POMC	POMC-1	GAATGTATYAAAGMMTGCAAGATGGWCCT	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Derecha
	POMC-2	TAYTGRCCTTYTTGTGGGCRRT	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Reversa
	POMC-3	TCTGCMGARTCWCCYGTGTTTCC	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Derecha
	POMC-4	TGGCATTYTTGAAAAGAGTCAT	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Reversa

Anexo 3. Protocolos para amplificar los genes mitocondriales y nucleares utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Gen	Protocolos
12s y 16s	1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C 9 ciclos: 30s 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C 30 ciclos: 30s 94 °C, 30s 50 °C, 1min 72 °C 1 ciclo: 5min 72 °C
16s	1 ciclo: 2min 94 °C 35 ciclos: 30s 94 °C, 30s 46 °C, 1min 72 °C 1 ciclo: 7min 72 °C
12s	1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 55 °C, 1min 72 °C 5 ciclos: 30s 94 °C, 30s 55 °C, 1min 72 °C 22 ciclos: 30s 94 °C, 30s 60 °C, 1min 72 °C 1 ciclo: 5min 72 °C
POMC	1 ciclo: 2min 96 °C 45 ciclos: 20s 95 °C, 25s 52 °C, 2min 72 °C 1 ciclo: 7min 72 °C
ND1	1 ciclo: 2min 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C 10 ciclos: 30s 94°C, 30s 50°C, 1min 72°C 29 ciclos: 30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C 1 ciclo: 5min 72°C

Anexo 4. Prueba estadística Kolmogorov-Smirnov para el análisis de la normalidad de las variables. LP= Longitud del pie, LC= Longitud de la cabeza, AC= Ancho de la cabeza, DO= Diámetro del ojo, DT= Diámetro del tímpano, LTI= Longitud de la tibia, LFE= Longitud del fémur.

Machos							
	LC	AC	DT	LTI	LFE	LP	DO
Kolmogorov Smirnov Z	0.047	0.092	0.052	0.078	0.067	0.066	0.079
Asimp. Sig. (2-colas)	0.200	0.019	0.200	0.086	0.200	0.200	0.075
Hembras							
Kolmogorov Smirnov Z	0.196	0.168	0.133	0.186	0.131	0.110	0.140
Asimp. Sig. (2-colas)	0.065	0.196	0.200	0.101	0.200	0.200	0.200

Anexo 5. Lista de individuos del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador incluidos en este estudio. Se indica el número de catálogo (QCAZ), la localidad, provincia, coordenadas, elevación, a qué clado pertenecen dentro de este estudio.

INDIVIDUOS QCAZ	LOCALIDAD	PROVINCIA	COORDENADAS		ELEVACIÓN	CLADO
					(m.s.n.m)	
6287	1 km Oeste de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.617	225	A
7225	Al Oeste de Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	160	A
7267	Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	253	A
13192	5 km O de Durango	Esmeraldas	1.063	-78.593	355	A
13193	5 km O de Durango	Esmeraldas	1.063	-78.593	355	A
13239	5 km O de Durango	Esmeraldas	1.063	-78.593	355	A
15512	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15513	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15514	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15515	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15516	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15517	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15518	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
15548	A 3 km de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	158	A
22696	A 3 km al oeste de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	355	A
22698	A 3 km al oeste de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	355	A
23063	Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	253	A
23153	A 3 km al oeste de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.636	355	A
23163	Durango. vía Borbón	Esmeraldas	1.088	-78.988	14	A
24776	Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	253	A
24777	Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	253	A
24778	Durango	Esmeraldas	1.0366	-78.608	253	A

Anexo 5. Continuación.

INDIVIDUOS QCAZ	LOCALIDAD	PROVINCIA	COORDENADAS		ELEVACIÓN	CLADO
					(m.s.n.m)	
24779	Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	253	A
24780	Durango	Esmeraldas	1.036	-78.608	253	A
26106	Durango-San Lorenzo	Esmeraldas	1.075	-78.653	74	A
27696	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29114	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29115	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29116	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29117	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29793	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29794	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29795	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29796	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29797	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
29798	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
30484	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
30489	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
30490	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
33314	4 km norte de Durango	Esmeraldas	1.074	-78.607	253	A
33315	4 km norte de Durango	Esmeraldas	1.074	-78.607	253	A
35963	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35964	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35965	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35966	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35967	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35968	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35969	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A

Anexo 5. Continuación.

INDIVIDUOS QCAZ	LOCALIDAD	PROVINCIA	COORDENADAS		ELEVACIÓN	CLADO
					(m.s.n.m)	
35970	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35971	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35972	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35973	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35974	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35975	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35976	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35977	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
35978	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.074	-78.665	220	A
40269	2 km este de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.627	85	A
40270	2 km este de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.627	85	A
40271	2 km este de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.627	85	A
40272	2 km este de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.627	85	A
40273	2 km este de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.627	85	A
40275	2 km este de Durango	Esmeraldas	1.037	-78.627	85	A
51855	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.037	-78.622	220	A
51856	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.037	-78.622	220	A
51870	Durango - San Francisco	Esmeraldas	1.037	-78.622	220	A
52865	Durango	Esmeraldas	1.037	-78.622	264	A
52866	Durango	Esmeraldas	1.037	-78.622	264	A
1052	Rio Palenque	Los Ríos	-0.571	-79.368	200	B
2321	Alluriquín	Santo Domingo	-0.311	-79.038	1100	B
3763	1 km este Maldonado	Pichincha	0.086	-79.044	745	B
3766	1 km este Maldonado	Pichincha	0.086	-79.044	745	B
3767	1 km este Maldonado	Pichincha	0.086	-79.044	745	B
4051	5 km NO. La Florida	Pichincha	-0.172	-79.141	900	B

Anexo 5. Continuación.

INDIVIDUOS QCAZ	LOCALIDAD	PROVINCIA	COORDENADAS		ELEVACIÓN	CLADO
					(m.s.n.m)	
4052	5 km NO. La Florida	Pichincha	-0.172	-79.141	900	B
4053	5 km NO. La Florida	Pichincha	-0.172	-79.141	900	B
7170	5 km al Noroeste de La Florida	Pichincha	-0.172	-79.141	1000	B
12035	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12036	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12037	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12038	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12850	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12851	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12852	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
12853	Santo Domingo. Hotel Zaracay	Santo Domingo	-0.257	-79.162	524	B
13875	Alluriquín - La Florida	Santo Domingo	-0.196	-79.137	524	B
13889	Alluriquín - La Florida	Santo Domingo	-0.196	-79.137	524	B
15355	Vía Toachi-Chiriboga	Pichincha	-0.305	-78.881	1315	B
19917	4 km NW La Florida.	Pichincha	-0.167	-79.141	896	B
19918	4 km NW La Florida.	Pichincha	-0.167	-79.141	896	B
19919	Cerca de Alluriquín	Santo Domingo	-0.322	-78.995	896	B
24359	La Unión del Toachi. Otongachi	Pichincha	-0.316	-78.956	901	B
31266	El Cinto	Pichincha	-0.069	-78.801	1190	B
33971	5 km O de la Florida	Santo Domingo	-0.203	-79.162	860	B
34143	Centro Científico Río Palenque	Los Ríos	-0.571	-79.368	200	B
35451	1 km antes de Maldonado	Pichincha	0.078	-79.035	209	B
39523	El Carmen. km 36 1/2 vía Chone	Manabí	-0.274	-79.459	300	B
40342	Rosa Zarate. Laguna del Cube	Esmeraldas	0.333	-79.466	207	B
40678	Caimito	Esmeraldas	0.704	-80.088	109	B
40679	Caimito	Esmeraldas	0.7046	-80.088	109	B

Anexo 5. Continuación.

INDIVIDUOS QCAZ	LOCALIDAD	PROVINCIA	COORDENADAS		ELEVACIÓN	CLADO
					(m.s.n.m)	
45264	C. Científico Río Palenque	Los Ríos	-0.571	-79.368	175	B
45265	C. Científico Río Palenque	Los Ríos	-0.571	-79.368	175	B
47091	C. Científico Río Palenque	Los Ríos	-0.571	-79.368	195	B
49360	5 km NO. La Florida	Pichincha	-0.203	-79.162	900	B
50021	Hotel Tinalandia	Santo Domingo	-0.303	-79.052	752	B
50022	Hotel Tinalandia	Santo Domingo	-0.303	-79.052	752	B
52298	Otongachi	Pichincha	-0.331	-78.937	901	B
52299	Otongachi	Pichincha	-0.331	-78.937	901	B
52412	Los Bancos	Pichincha	0.008	-78.903	826	B
52413	Los Bancos	Pichincha	0.008	-78.903	826	B
3715	Rio Patul.	Cañar	-2.556	-79.372	350	C
3716	Rio Patul	Cañar	-2.556	-79.372	350	C
3717	Rio Patul	Cañar	-2.556	-79.372	350	C
3718	Rio Patul	Cañar	-2.556	-79.372	350	C
12774	Manta Real	Cañar	-2.556	-79.366	500	C
12775	Manta Real	Cañar	-2.556	-79.366	465	C
12776	Manta Real	Cañar	-2.556	-79.366	500	C
12777	Manta Real	Cañar	-2.556	-79.366	465	C
13866	A 300 m de Manta Real	Cañar	-2.553	-79.364	465	C
13883	A 300 m de Manta Real	Cañar	-2.553	-79.364	465	C
13885	A 300 m de Manta Real	Cañar	-2.553	-79.364	465	C
13897	Manta Real	Cañar	-2.553	-79.364	465	C
13899	Manta Real	Cañar	-2.553	-79.364	465	C
23680	Huaquillas-La Cuca.	Guayas	-3.474	-80.223	53	C
30594	Carretera La Avanzada	El Oro	-3.584	-79.933	250	C
30595	Carretera La Avanzada	El Oro	-3.584	-79.933	250	C

Anexo 5. Continuación.

INDIVIDUOS QCAZ	LOCALIDAD	PROVINCIA	COORDENADAS		ELEVACIÓN	CLADO
					(m.s.n.m)	
37254	Parroquia Bella María	El Oro	-3.516	-79.916	282	C
45315	Quebrada Carabota	El Oro	-3.328	-79.581	395	C
45316	Quebrada Carabota	El Oro	-3.328	-79.581	395	C
45317	Quebrada Carabota	El Oro	-3.328	-79.581	395	C
45318	Quebrada Carabota	El Oro	-3.328	-79.581	395	C
51471	Puyango	Loja	-3.881	-80.089	360	C

Anexo 6. Capas climáticas no correlacionadas usadas para el modelamiento de nicho (Menendez y Graham, 2013)

CÓDIGO	VARIABLE CLIMÁTICA
BIO1	Temperatura Media Anual
BIO2	Tasa Media Diurna (Media Mensual (max temp - min temp))
BIO4	Temperatura Estacional (desviación estandar *100)
BIO5	Máxima Temperatura del Mes más caliente.
BIO6	Temperatura Mínima del Mes más frío
BIO12	Precipitación Anual
BIO18	Precipitación del Trimestre más Caliente
BIO19	Precipitación del Trimestre más Frío

Anexo 7. Estimaciones de las contribuciones relativas de las variables ambientales en el primer modelo (Clado A) de Maxent.

VARIABLE	PORCENTAJE DE CONTRIBUCION	IMPORTANCIA DE PERMUTACIÓN
Temperatura estacional	41.5	72.6
Tasa Media diurna	29.1	1.6
Min. temp. mes más frío	16	12.3
Precip. del trimestre más caliente	10.4	9.7
Precipitación anual	1.5	3.8
Precip. del trimestre más frío	1.5	0
Max. temp. mes más caliente.	0	0
Temperatura media anual	0	0

Anexo 8. Estimaciones de las contribuciones relativas de las variables ambientales en el primer modelo (Clado B) de Maxent.

VARIABLE	PORCENTAJE DE CONTRIBUCION	IMPORTANCIA DE PERMUTACIÓN
Precip. del trimestre más caliente	63.3	68.6
Precip. del trimestre más frío	19.8	17.7
Temperatura media anual	11.8	0
Max. temp. mes más caliente.	3.9	11.4
Tasa media diurna	0.8	1.4
Temperatura estacional	0.4	0
Min. temp. mes más frío	0	0.9
Precipitación anual	0	0

Anexo 9. Estimaciones de las contribuciones relativas de las variables ambientales en el primer modelo (Clado C) de Maxent.

VARIABLE	PORCENTAJE DE CONTRIBUCION	IMPORTANCIA DE PERMUTACIÓN
Precip. del trimestre más frío	79.5	98.1
Temperatura media anual	17.4	0
Min. temp. mes más frío	2.7	0.3
Max. temp. mes más caliente.	0.2	0.7
Temperatura estacional	0.1	0.9
Tasa media diaria	0	0
Precip. del trimestre más caliente	0	0
Precipitación anual	0	0