

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Filogeografía de las lagartijas andinas del género *Pholidobolus* (Squamata:
Gymnophthalmidae) en Ecuador**

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

PAOLA MICAELA MAFLA ENDARA

Quito, 2011

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

Ph.D. Omar Torres Carvajal
Director de la Disertación
29 de Junio de 2011

A mi familia y a Juan Pablo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Omar Torres Carvajal, director de la disertación, por brindarme la oportunidad de realizar este estudio, por su confianza, apoyo, paciencia, consejos, amistad y por compartir sus conocimientos y experiencias. A Santiago Ron y Santiago Burneo por sus comentarios y aportes. A María Eugenia Ordoñez y Charlie Barnes por sus consejos y asistencia en el Laboratorio de Molecular. A Pablo Menéndez, Sofía Carvajal, Amaranta Carvajal, Diego Páez, Fernando Ayala, Ítalo Tapia y asistentes del Laboratorio de Molecular por brindarme sus conocimientos y experiencias. A Juan Pablo Almeida, Eugenia Endara, Silvia Aldás, Amaranta Carvajal, Omar Torres Carvajal, Selene Báez, Freddy Velásquez, Camila Mafla, Andrea Vargas y Elicio Tapia por su ayuda en el campo. A mi familia, amigas y amigos, por sus consejos y apoyo incondicional. A Vanessa Aguirre por acompañarme en todo momento y brindarme cariño y consejos. Un agradecimiento muy especial a Juan Pablo Almeida por su cariño, constante apoyo y sus valiosos consejos. Finalmente, a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al SENESCYT No. 008-09 ICFAU-DNB/MA por el financiamiento de la presente investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLAS DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xv
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 ANTECEDENTES.....	8
3.2 OBJETIVOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	10
4.1.1 EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN.....	11
4.1.2 ENSAMBLAJE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE ADN.....	12
4.1.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	12
4.1.3.1 ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA.....	13
4.1.3.2 ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	13
4.1.3.3 ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA Y ESTIMACIONES DE TIEMPO DE DIVERGENCIA.....	14
4.1.4 DISTANCIAS GENÉTICAS.....	15

4.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS.....	15
4.2.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS.....	16
4.2.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS.....	16
4.2.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS.....	18
4.3 ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS.....	20
4.3.1 CONSTRUCCIÓN DE RED DE HALPOTIPOS PARA <i>P. MACBRYDEI</i>	20
4.3.2 TEST DE MANTEL.....	20
4.3.3 MODELAMIENTO DE NICHOS.....	21
4.3.3.1 ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS.....	23
5.1.1 ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA.....	23
5.1.2 ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	24
5.1.3 ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA.....	25
5.1.4 ESTIMACIONES DE TIEMPO DE DIVERGENCIA.....	26
5.1.5 DISTANCIAS GENÉTICAS.....	26
5.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS.....	27
5.2.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS.....	27
5.2.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS.....	28
5.2.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS.....	29
5.3 ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS.....	30
5.3.1 CONSTRUCCIÓN DE RED DE HAPLOTIPOS PARA <i>P. MACBRYDEI</i>	30

5.3.2 TEST DE MANTEL.....	31
5.3.3 MODELAMIENTO DE NICHOS.....	31
5.3.3.1 ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	32
6. DISCUSIÓN.....	33
6.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS.....	33
6.2 DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA.....	34
6.2 DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	36
6.3 FILOGEOGRAFÍA.....	37
6.3.1 LÍMITES DE ESPECIES.....	37
6.3.2 PATRONES DE DIVERSIFICACIÓN.....	41
6.4 CONCLUSIONES.....	43
7. LITERATURA CITADA.....	45
8. FIGURAS.....	56
9. TABLAS.....	84
10. ANEXOS.....	112

LISTA DE FIGURAS

1. Fotografías de las cinco especies de <i>Pholidobolus</i>	57
2. Mapa de las localidades visitadas en el presente estudio.....	58
3. Variables morfológicas cualitativas de <i>Pholidobolus</i>	59
4. Árbol consenso con regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y ND4.....	60
5. Filograma del análisis de máxima verosimilitud de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y ND4.....	61
6. Filograma del análisis bayesiano de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y ND4.....	62
7. Árbol filogenético del análisis bayesiano que estima tiempo de divergencia entre clados.....	63
8. Proyección de las variables morfológicas cualitativas sobre las funciones F1 y F2 del análisis discriminante de machos y hembras adultos, pertenecientes a las cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	64
9. Proyección de las variables morfológicas cuantitativas sobre los componentes principales CP1 y CP2 del análisis de componentes principales de machos y hembras adultos, pertenecientes a las cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	65
10. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas a lo largo del margen de la mandíbula superior (SUJ) y número de escamas a lo largo de la mandíbula inferior (SLJ) en cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	66
11. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas gulares y mandibulares (SGJ), número de escamas ventrales (SGV) y número de escamas dorsales (DEL) en cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	67

12. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas temporales (NTS) en cinco especies del género *Pholidobolus*.....68
13. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas alrededor del cuerpo (SAB), número de escamas alrededor de la cola (SAT) y número de escamas alo largo de la extremidad anterior (SAF) en cinco especies del género *Pholidobolus*.....69
14. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas del cuarto dedo de la pata posterior (ST4) en cinco especies del género *Pholidobolus*.....70
15. Proyección de las variables morfométricas de hembras adultos sobre los componentes principales CP1 y CP2 del análisis de componentes principales, pertenecientes a las cinco especies del género *Pholidobolus*.....71
16. Proyección de las variables morfométricas de machos adultos sobre los componentes principales CP1 y CP2 del análisis de componentes principales, pertenecientes a las cinco especies del género *Pholidobolus*.....72
17. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en la variable morfométrica longitud rostro-cloaca (SVL) en cinco especies del género *Pholidobolus*.....73
18. Red de haplotipos de los genes mitocondriales ND4, 12S y 16S de *P. macbrydei*.....74
19. Matriz de correlación de distancias geográficas y distancias genéticas del gen mitocondrial 16S de los cinco clados de *Pholidobolus*.....75
20. Matriz de correlación de distancias geográficas y distancias genéticas de los genes mitocondriales ND4, 12S y 16S de *P. macbrydei*.....76

21. Modelo predictivo de nicho ecológico de las cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	77
22. Modelo predictivo de nicho ecológico de <i>P. affinis</i> y <i>P. prefrontalis</i>	78
23. Modelo predictivo de nicho ecológico de las especies <i>P. macbrydei</i> y <i>P. montium</i>	79
24. Proyección de los puntos aleatorios extraídos de los modelos de nicho asociados a las 19 variables bioclimáticas sobre las funciones F1 y F2 del análisis discriminante, de las cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	80
25. Proyección geográfica de los puntos aleatorios extraídos de los modelos de nicho asociados a las 19 variables bioclimáticas, pertenecientes a la especie <i>P. annectens</i>	81
26. Cladograma de <i>Pholidobolus</i> basado en aloenzimas (Hillis, 1985).....	82
27. Fotografías de individuos machos adultos de <i>P. macbrydei</i>	83

LISTA DE TABLAS

1. Lista de genes con sus respectivos cebadores y secuencias (5' a 3') de ADN citados por Pellegrino <i>et al.</i> , 2001.....	85
2. Protocolos para la amplificación de los genes mitocondriales, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	86
3. Variables bioclimáticas obtenidas de Worldclim.....	87
4. Parámetros escogidos para la evaluación de la capacidad predictiva de los cinco modelos del género <i>Pholidobolus</i>	88
5. Modelos de evolución obtenidos del JModelTest en base al criterio de información Akaike (AIC).....	89
6. Comparación de las distancias genéticas del gen mitocondrial 16s entre los cinco clados.....	90
7. Resultados del análisis discriminante que indica el porcentaje de variancia aportado por cada función para las variables morfológicas cualitativas de machos y hembras adultos.....	91
8. Resultados del análisis discriminante que indica el porcentaje de correlación de cada variable cualitativa categórica de machos y hembras adultos de los cinco clados con cada función discriminante.....	92
9. Resultados del análisis discriminante que indica el número y el porcentaje de individuos predichos por grupo para las variables morfológicas cualitativas de machos y hembras adultos de las cinco especies del género <i>Pholidobolus</i>	93
10. Resultados de la prueba de análisis de variancia no paramétrico que indica si existen o no diferencias significativas entre machos y hembras de los cuatro clados para las variables morfológicas cuantitativas.....	94
11. Resultados de la prueba de análisis de variancia no paramétrico que indica si existen o no diferencias significativas entre los cuatro clados para las variables morfológicas cuantitativas.....	95
12. Resultados del análisis discriminante que indica el porcentaje que aporta cada variable morfológica cuantitativa de machos y hembras adultos de los cuatro clados.....	96
13. Resultados del análisis de Kruskal-Wallis que indica las diferencias estadísticamente significativas de cada variable morfológica cuantitativa entre cada clado.....	97

14. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje de variancia aportado por cada componente para las variables morfológicas cuantitativas de machos y hembras adultos de los cinco clados.....	98
15. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje que aporta cada variable morfológica cuantitativa de machos y hembras adultos de los cinco clados.....	99
16. Resultados de la prueba del análisis multivariado de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre machos y hembras adultos de los cuatro clados para las variables morfométricas.....	100
17. Resultados de la prueba del análisis multivariado de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variables morfométricas de los cuatro clados de hembras adultos.....	101
18. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje de variancia aportado por cada componente para las variables morfométricas de hembras adultas.....	102
19. Resultado del análisis de componentes principales que indica el porcentaje que aporta cada variable morfométrica de hembras adultas de los cinco clados.....	103
20. Resultados de la prueba del análisis multivariado de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variables morfométricas de los cuatro clados de machos adultos.....	104
21. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje de variancia aportado por cada componente para las variables morfométricas de machos adultos.....	105
22. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje que aporta cada variable morfométrica de machos adultos de los cinco clados.....	106
23. Resultados de la prueba de análisis de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre sexos de la variable morfométrica longitud rostro-cloaca de los cuatro clados.....	107
24. Resultados de la prueba del análisis de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variable morfométrica longitud rostro-cloaca de los cuatro clados de hembras adultos.....	108

25. Resultados de la prueba del análisis de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variable morfométrica longitud rostro-cloaca de los cuatro clados de machos adultos.....	109
26. Resultados de la evaluación del análisis del Área Bajo la Curva ROC de los cinco modelos de predicción de nicho del género <i>Pholidobolus</i>	110
27. Resultados del análisis discriminante que indicar el porcentaje de variancia y correlación aportado por cada función para las 19 variables bioclimáticas.....	111

LISTA DE ANEXOS

1. Lista de individuos colectados durante el estudio y depositados en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....113
2. Protocolo de extracción de ADN con tiocianato de guanidina.....116
3. Protocolo de electroforesis en gel de agarosa y tinción de ADN con sybr safe.....118

1. RESUMEN

Análisis ecológicos, rasgos geográficos y caracterización genética son herramientas útiles para analizar la evolución, distribución y límites de especies. Esta investigación utilizó este tipo de evidencias para conocer la influencia de la cordillera de los Andes en la historia natural, rango geográfico y diversificación de las lagartijas andinas del género *Pholidobolus* (Squamata: Gymnophthalmidae). Análisis de máxima parsimonia revelaron que la especie *P. macbrydei* es un grupo parafilético. Análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud resultaron en topologías similares, en las que se identifican dos grandes clados dentro del género *Pholidobolus*. Uno de los clados contiene dos especies (*P. affinis* y *P. montium*), su distribución abarca los valles centrales y norte del Ecuador respectivamente. El otro clado contiene tres especies (*P. annectens*, *P. prefrontalis* y *P. macbrydei*), su distribución abarca los valles centrales, áreas del sur y crestas y laderas de las Cordilleras Oriental y Occidental del Ecuador. Además, la filogenia basada en ADN mitocondrial reveló que poblaciones de *P. macbrydei* están divididos en dos grupos recíprocamente monofiléticos (unidades evolutivas significativas); asimismo, esta filogenia reflejó un posible caso de introgresión entre poblaciones de *P. macbrydei* y *P. prefrontalis*. Por otro lado, se encontró que los patrones de divergencia genética están asociados con los patrones de divergencia morfológica y nicho ecológico. En otro aspecto, los resultados sugieren que la evolución de *Pholidobolus* estuvo influenciada por el reciente levantamiento de los Andes del norte. Finalmente se concluye que los mecanismos de especiación ecológica y parapátrica son los modelos de diversificación más consistentes en *Pholidobolus*.

Palabras clave: Andes, Ecuador, datos ecológicos, unidades evolutivas significativas, divergencia genética, hibridación introgresiva, patrones morfológicos, especiación, *Pholidobolus*.

2. ABSTRACT

Ecological analyses, geographic approach and genetics characterization, are useful tools for the analyses of species evolution, distribution and delimitation. This study uses this kind of evidences in order to know how The Andes mountain range has influenced the natural history, geographic range and diversification of the Andean lizards of the genus *Pholidobolus* (Squamata: Gymnophthalmidae). Maximum parsimony analyses indicate that *P. macbrydei* belongs to a paraphyletic group. Bayesian inference and maximum likelihood analysis resulted in similar topologies, which indicate that species of *Pholidobolus* are nested within two major clades. One of these clades contains two species (*P. affinis* y *P. montium*) occurring between valleys in the central and northern ranges of Ecuador, whereas the other clade contains three species (*P. annectens*, *P. prefrontalis* y *P. macbrydei*) occurring between valleys in the central and southern ranges, and along the crests and slopes of the Western and Eastern Cordilleras of Ecuador. Furthermore, it was found that patterns of genetic divergence are associated with radiation in the morphological patterns and ecological niche. In addition, the phylogeny based on mtDNA revealed that *P. macbrydei* populations are divided into two reciprocally monophyletic groups (evolutionarily significant units); moreover, it revealed a probably case of introgressive hybridization between *P. macbrydei* and *P. prefrontalis* populations. In the other hand, the results suggest that the evolution of *Pholidobolus* was influenced with the recent uplift of the northern Andes. Finally, I conclude that ecological and parapatric speciation as the most consistent models of diversification in *Pholidobolus*.

Keywords: Andes, Ecuador, ecological niche, evolutionarily significant units, divergence genetic, introgressive hybridization, morphological patterns, speciation, *Pholidobolus*.

3. INTRODUCCIÓN

Por su compleja topografía y heterogeneidad de ambientes, la Cordillera de los Andes es una región ideal para estudios biogeográficos, genéticos, ecológicos y de especiación (e.g., Chesser, 2000). Esta complejidad es el resultado tanto de eventos tectónicos, por ejemplo la subducción de las placas de Nazca bajo la placa sudamericana (formación de los Andes) en el Mesozoico tardío, como de fluctuaciones climáticas, por ejemplo las glaciaciones del Pleistoceno (Duellman, 1979; Moret, 2005; Veblen *et al.*, 2007).

En base a su origen geológico se pueden distinguir tres regiones andinas: australes, centrales y septentrionales. Ecuador pertenece a los Andes septentrionales, los cuales se caracterizan por poseer cadenas montañosas relativamente jóvenes que empezaron a elevarse en el Mioceno (25 millones de años atrás) y mantuvieron una intensidad volcánica relativamente alta hasta el Cuaternario, 2,5 millones de años atrás (Moret, 2005).

El levantamiento de estas cadenas montañosas tuvo un fuerte impacto en la composición biótica, debido principalmente a dos factores: (1) la imposición de barreras físicas y (2) las constricciones altitudinales (Veblen *et al.*, 2007). La formación de barreras físicas redujo contacto potencial y flujo génico entre organismos (Albert y Crampton, 2010); además, la posición de la barrera norte-sur de los Andes afectó la circulación atmosférica y oceánica, generando diferencias macro y microclimáticas entre las laderas orientales y occidentales, así como en las tierras bajas adyacentes (Gómez y Little, 1981; Gregory-Wodzicki, 2000). Por otro lado, las constricciones altitudinales cambiaron la distribución y migración de la flora y fauna como resultado de la sucesión vertical única de ecozonas, las cuales van desde bosques lluviosos hasta desiertos (Gómez y Little, 1981; Graham, 2009).

Otros factores que influenciaron la composición biótica actual fueron la actividad volcánica y las fluctuaciones climáticas durante el Pleistoceno, los cuales causaron la fragmentación y aislamiento de poblaciones (Howes *et al.*, 2006; Koscinski *et al.*, 2008). Durante los periodos glaciares del Pleistoceno, los cinturones altitudinales de páramo y bosque montano se desplazaron hacia altitudes menores, cambiando la composición florística y faunística de los pisos altitudinales. Por otro lado, en los periodos interglaciares hubo reducción de tamaño poblacional, aislamiento y diferenciación de poblaciones altoandinas (Simpson, 1979; Moret, 2005).

En este escenario se dio origen a una gran diversidad de organismos (Koscinski, *et al.*, 2008). Esto se puede observar en muchos clados de anfibios y reptiles que se distribuyen longitudinalmente en la Cordillera de los Andes (e.g., Montanucci, 1973; Doan, 2003; Navas, 2006). Sin embargo, no existe un patrón de especiación único que explique la distribución de las especies; tomando en cuenta, además, que la delimitación de especies es compleja (Wiens, 2004; de Queiroz, 2005). Por este motivo, es importante integrar evidencias tales como hipótesis filogenéticas, información geográfica y datos ecológicos, con el fin de determinar los factores que influyen la evolución y distribución de especies (Graham, *et al.*, 2004). Las hipótesis filogenéticas son herramientas básicas para estudiar relaciones evolutivas entre los organismos (Lemey *et al.*, 2009). La información geográfica permite conocer espacialmente la distribución de los organismos, que podría explicar el límite de tolerancia fisiológica o etológica en un determinado ambiente, además de que puede proveer datos sobre barreras que impiden la migración y flujo génico (Bull, 1991; Veblen *et al.*, 2007). Datos ecológicos como los nichos permiten identificar las condiciones ambientales y recursos necesarios para que un organismo mantenga su población viable (Graham *et al.*, 2004). A través del modelamiento de nicho se puede obtener la proyección geográfica del área potencial que ocupa la especie (nicho

fundamental), el cual analiza solamente la interacción de factores abióticos, por lo que el organismo no necesariamente ocupa toda el área predicha. Para determinar el área que realmente ocupa el organismo (nicho realizado), se incluye también las interacciones bióticas, como la depredación, competencia, etc. (Peterson, 2001).

Bajo estos parámetros, los representantes de la familia Gymnophthalmidae constituyen un buen grupo para el estudio de patrones de especiación y distribución de especies, ya que se encuentran exclusivamente en la zona Neotropical, desde el sur de México hasta Argentina, ocupando áreas abiertas desde los altos Andes hasta los bosques tropicales de tierras bajas (Pellegrino *et al.*, 2001). Comprenden aproximadamente 38 géneros y más de 160 especies (Castoe *et al.*, 2004; Vitt y Caldwell, 2009), de los cuales 13 géneros y 49 especies ocurren en Ecuador (Torres-Carvajal, 2000-2009), con un alto porcentaje de endemismo (54,1%), superado tan sólo por Tropidurinae (59,2%) en lo que concierne al orden Squamata (Valencia *et al.*, 2008). Entre los taxa ecuatorianos, el género *Pholidobolus* (Figura 1) constituye un grupo ideal de estudio, ya que su distribución longitudinal en los Andes (sur de Colombia, los Andes del Ecuador, norte de Perú y el Cusco) entre los 1 800 y 4 000 msnm, desde valles interandinos hasta los páramos (Reeder, 1996), sugiere que su especiación tuvo origen con el levantamiento de la Cordillera de los Andes. En total se han descrito siete especies, siendo cuatro (*P. affinis*, *P. annectens*, *P. macbrydei* y *P. prefrontalis*) endémicas del Ecuador; *P. montium* ha sido reportada para el sur de Colombia y Ecuador (Reeder, 1996), y las dos especies restantes son endémicas del Perú; *P. anomalus* ha sido reportada en el Cusco y *P. huancabambae* se distribuye en la depresión de Huancabamba (Reeder, 1996). Este género se caracteriza por ser de tamaño pequeño, no más de 190 mm de longitud total, con extremidades cortas pero bien desarrolladas, escamas dorsales y ventrales imbricadas, forma del cuerpo aplanada y franjas longitudinales de color crema o marrón. Se distingue de otros géneros de la familia

Gymnophthalmidae por la combinación de los siguientes caracteres: (1) longitud rostro-cloacal máxima de 66 mm; (2) la cola representa el 69% o menos de la longitud total del cuerpo; (3) extremidades pentadáctilas y garras en los dígitos; (4) cuerpo y cola cilíndricas, cuello no muy constreñido; (5) cabeza distintivamente aplanada; (6) tímpano profundamente ahuecado; (7) hocico obtusamente puntiagudo; (8) fosas nasales agudas; (9) escamas dorsales imbricadas y débilmente quilladas a estriadas con algunas escamas placoideas; (10) escamas dorsales en series transversales; (11) escamas dorsales más largas que anchas, con formas cuadrangulares a subhexagonales; (12) escamas gulares lisas, imbricadas, más largas posteriormente; (13) dos filas medias amplias de escamas gulares anterior al pliegue gular; (14) escamas ventrales lisas e imbricadas; (15) escamas ventrales rectangulares, dispuestas en series transversales y longitudinales; (16) lengua con papilas en forma de escamas imbricadas; (17) hemipenes con diminutos espinos calcáreos; (18) 26-27 vértebras presacrales; (19) 21-23 costillas; (20) 5-6 pares de costillas unidas a la cintura pectoral; (21) un par de costillas abdominales unidas unas a otras en la parte media ventral, posterior al cifiesternón (Montanucci, 1973).

Las especies de *Pholidobolus* ocupan preferentemente áreas abiertas, tanto húmedas como áridas, bajo rocas, troncos y en pastizales (Montanucci, 1973). Las características morfológicas principales que permiten la diferenciación entre especies del género *Pholidobolus* se observan en las escamas de la cabeza (número de escamas prefrontales y supraoculares), escamas en el párpado inferior, forma de escamas dorsales, presencia de gránulos laterales y pliegue lateral, presencia de poros femorales y coloración. Otras características que contribuyen a la delimitación de estas especies son su distribución y nicho ecológico.

Sin embargo, estos rangos geográficos pueden variar, como es el caso de la especie *P. affinis*, cuya distribución ha cambiado en los últimos años. En 1973, la zona de Mulaló

(provincia de Cotopaxi) fue reportada como zona de simpatría para las especies *P. affinis* y *P. montium*, siendo *P. affinis* la especie con mayor densidad poblacional (Montanucci, 1973). Hillis y Simmons (1986) en 1984 reportaron únicamente la presencia de *P. montium* en Mulaló, además señalaron que esta localidad había sido alterada por la acción del ser humano. Dado estos dos eventos, dedujeron que el cambio dramático inducido por el ser humano (eliminación de rocas, plantaciones e intensa irrigación) le confirió mayor ventaja adaptativa a *P. montium*, cuya tolerancia a la humedad es mayor, desplazando a *P. affinis* hacia el sur.

Por otro lado, Montanucci (1973) reportó posibles casos de hibridación en la zona simpátrica de Tixán, entre las especies *P. affinis* y *P. prefrontalis*. A pesar de que los investigadores observaron tan solo interacciones sexuales intraespecíficas, encontraron dos individuos que, pese a tener la respectiva coloración y escamación cefálica características de una especie, poseían caracteres merísticos de la otra especie. Finalmente, se concluyó que en caso de existir hibridación, ésta era infrecuente según Montanucci (1973). Además, a pesar de no haber encontrado evidencias sobre una posible hibridación entre *P. macbrydei* y *P. prefrontalis*, se sugiere que estas dos especies podrían estar en contacto (posible zona de simpatría) en el valle sur de Cutchil, ya que se encontró individuos de *P. macbrydei* y *P. prefrontalis* ocupando áreas separadas tan sólo por 2 km (Montanucci, 1973).

Dadas estas circunstancias, se esperaría que tanto los aspectos morfológicos como los ecológicos varíen intraespecíficamente. Como consecuencia, los límites entre especies establecidos por estos criterios no son siempre claros.

3.1 ANTECEDENTES

Estudios previos de relaciones de parentesco en *Pholidobolus* fueron realizados por Montanucci (1973), quien empleó el método de *Prim Network* para construir un diagrama de Wagner en base a caracteres morfológicos. Este método utiliza el criterio de Wagner que identifica varios componentes para estimar caracteres ancestrales, como: (1) caracteres presentes en numerosos representantes de grupos cercanamente relacionados; (2) caracteres ampliamente distribuidos dentro de un grupo más que cualquier otro carácter derivado, y (3) caracteres asociados con otros caracteres que se conocen son primitivos. Algunos de los problemas al utilizar estos métodos es que tienen limitaciones al tratar con especies cercanamente relacionadas que pertenecen a un solo género (Montanucci, 1973). Actualmente, existen nuevas técnicas que delimitan los estados de los caracteres de manera más precisa, además de que permiten la inclusión de caracteres polimórficos y morfométricos (Smith y Gutberlet, 2001; Wiens, 2001). A pesar de esto, la contribución de Montanucci (1973) en delimitar estas especies (basándose en características morfológicas y distribución geográfica) y proponer los posibles eventos que favorecieron la especiación de *Pholidobolus* (Montanucci, 1973), constituyen una base fundamental para un estudio evolutivo moderno de este género.

Otro estudio para esclarecer las relaciones evolutivas en *Pholidobolus* fue realizado por Hillis (1985), quien utilizó datos de aloenzimas para construir árboles de distancias de Wagner y fenogramas UPGMA. En el cladograma se indica que la especie con más caracteres primitivos es *P. affinis* y la especie con más caracteres derivados es *P. annectens*, además ubica a este último como taxón hermano de *P. montium*. Por otro lado, señala que los caracteres morfológicos estudiados por Montanucci (1973) son más congruentes con su cladograma. Sin embargo, uno de los problemas con estos análisis fue que se limitan a calcular una matriz de semejanzas o distancias entre pares de taxones, lo

cual representa un análisis bastante incompleto de la información genética de un organismo (Hillis *et al.*, 1996); además de que las aloenzimas revelan poca variación en comparación con la información obtenida de genes mitocondriales (Eguiarte *et al.*, 2007).

A pesar de que el género *Pholidobolus* está representado por pocas especies, no existe aún un estudio filogenético con datos de secuencias de ADN analizados con metodologías modernas (máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana). Una vez obtenido un árbol filogenético robusto y un análisis morfológico adecuado, se pueden realizar análisis filogeográficos, los cuales permiten investigar la interacción de los procesos genealógicos con la dinámica de los procesos geológicos y climáticos (Avise, 2000; Eguiarte *et al.*, 2007), además de que contribuyen a la delimitación de las especies e identificación de unidades prioritarias de conservación (Eguiarte *et al.*, 2007).

3.2 OBJETIVOS

- **General:**
 - Inferir la historia evolutiva y radiación del género *Pholidobolus* en Ecuador.

- **Específicos:**
 - Inferir las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Pholidobolus* que habitan en Ecuador.
 - Determinar la variabilidad genética entre especies y poblaciones.
 - Determinar la variabilidad morfológica entre especies.
 - Evaluar los límites entre especies de *Pholidobolus*
 - Identificar patrones de diversificación y origen del género *Pholidobolus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio abarcó varias localidades visitadas por Montanucci (1973) y algunas localidades situadas cerca de la carretera Panamericana en la Cordillera de los Andes del Ecuador entre los 1800 y 4200 m (Figura 2). El trabajo de campo se realizó desde el mes de julio del 2009 hasta el mes de abril del 2010. Los individuos colectados fueron depositados en la Sección de Reptiles del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ), bajo el permiso de colección No. 008-09 IC-FAU-DNB/MA emitido por el Ministerio del Ambiente. Los tejidos extraídos (hígado o músculo) fueron conservados en etanol al 95% y depositados en ultracongeladoras a -80 °C en la misma institución.

4.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Para los análisis filogenéticos se escogieron 91 tejidos de especímenes representativos de las localidades visitadas (Figura 2, Anexo 1) y se usaron las secuencias de un individuo de la especie *P. macbrydei* (GenBank: AY507886, AY507896 y AY507867) y un individuo de la especie *P. montium* (GenBank: AF420884, AF420756 y AF420701). Como grupos externos se escogieron a *Cercosaura ocellata* y *Potamites ecpleopus*, pertenecientes a la tribu Cercosaurini de la familia Gymnophthalmidae. Cabe señalar que se excluyó al gen nuclear c-mos, utilizado previamente en estudios filogenéticos de gimnoftálmidos (e.g., Castoe *et al.*, 2004), ya que análisis preliminares demostraron que este gen es bastante conservado en *Pholidobolus*.

4.1.1 EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO DEL ADN

En primera instancia, se extrajo ADN de los tejidos (hígado o músculo) mediante el protocolo de M. Fujita (no publicado), con cambios realizados por M. Ordoñez del Laboratorio Molecular de Herpetología (Anexo 2).

Una vez extraído el ADN, se utilizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y los cebadores 12Sa, 12Sb, 16SL, 16SH, 16SF.0, 16SR.0, ND4F y ND4R para la amplificación de segmentos de los genes mitocondriales 12S (~ 394 pares de bases), 16S (~ 514 pb) y ND4 (~ 623 pb) respectivamente (Tabla 1). Se preparó el mix de reacción de PCR con 25 µl de volumen final, el cual contenía 18,25 µl de dH₂O, 2,5 µl de búfer 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 0,5 µl de cebador directo 10 uM, 0,5 ul de cebador inverso 10 uM, 0,25 µl de polimerasa Taq 5 U/µl y 1 µl de ADN (concentración aproximada de 20 – 25 ng/ µl).

Los protocolos para cada amplificación se basaron en Pellegrino (2001), con algunas modificaciones basadas en los protocolos estandarizados del Laboratorio Molecular de Herpetología (Tabla 2). Posteriormente se construyeron geles de agarosa al 1% para comprobar mediante electroforesis los productos positivos del PCR (Anexo 3). Estos productos positivos fueron purificados (eliminación de desoxinucleótidos y cebadores) con ExoSAP-IT (GG Healthcare) en el termociclador. El protocolo para esta reacción fue de un ciclo de 37°C por 30 minutos, seguido de otro ciclo de 80°C por 15 minutos. Finalmente los productos de PCR fueron enviados a Macrogen de Seoul, Korea, para su secuenciamiento.

4.1.2 ENSAMBLAJE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE ADN

Las dos secuencias (forward y reverse) para cada muestra, fueron ensambladas en el software Geneious Pro v.5.1.4 (Biomatters, 2005-2010). Se cortaron los extremos con mala resolución y se editaron manualmente las incongruencias, para así obtener secuencias de consenso, las cuales fueron alineadas en el mismo software. Las secuencias de 12S y 16S fueron alineadas con el programa MAFFT, ya que facilita el alineamiento de estructuras secundarias (Kato *et al.*, 2002; Kato y Toh, 2008). Las secuencias de ND4 fueron alineadas con el programa MUSCLE por su precisión muy alta y gran rendimiento (Edgar, 2004; Edgar y Batzoglou, 2006). Se utilizó el programa Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010) para traducir las secuencias de ND4 a aminoácidos para corroborar que estén bien alineadas. Las 91 secuencias serán depositadas en Genbank.

4.1.3 ANALISIS FILOGENÉTICOS

Se utilizaron los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud, e inferencia bayesiana para los análisis filogenéticos de las secuencias de ADN. En primera instancia se realizó un árbol para cada gen para evaluar la consistencia entre las topologías. Luego se generó un árbol con los tres genes combinados (dos genes mitocondriales ribosomales (12S+16S) y un gen mitocondrial codificador de proteínas ND4) para cada uno de los criterios de optimalidad. Para los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos, los modelos de evolución fueron seleccionados en JModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) bajo el criterio de Información de Akaike (AIC), el cual tiene la ventaja de comparar modelos anidados y no anidados (Lemey *et al.*, 2009).

4.1.3.1 ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA

Los árboles de máxima parsimonia fueron estimados usando PAUP 4.0 (Swofford, 2002). En el análisis de máxima parsimonia para los genes combinados se consideraron a todos los caracteres de tipo no-ordenado con igual peso. Los gaps fueron tratados como datos faltantes. La posición de la raíz fue marcada por los grupos externos *Cercosaura ocellata* y *Potamites eupleopus*. Se realizó una búsqueda heurística con 10 000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva, utilizando el algoritmo de barrido de ramas (branch-swapping) por bisección y reconexión de árboles (tree bisection and reconnection, TBR). Además se empleó la técnica de bootstrap no paramétrico para evaluar el soporte de cada nodo, con 1 000 réplicas de bootstrap y 5 réplicas aleatorias de secuencia aditiva, empleando asimismo el algoritmo de barrido de ramas por bisección y reconexión de árboles. El consenso de los árboles fue obtenido en PAUP 4.0 (Swofford, 2002) utilizando la regla mayoritaria del 50%.

4.1.3.2 ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

Los árboles de máxima verosimilitud fueron estimados con el programa GARLI v.0.951 (Zwickl, 2006), sin partición de datos. Se escogió el modelo de sustitución nucleotídica estimado en JModeltest; los valores de los demás parámetros no fueron modificados por recomendación del autor (Zwickl, 2006). Se realizaron 50 análisis independientes para asegurar que los valores de likelihood sean consistentes. Además se empleó la técnica de bootstrap no paramétrico para evaluar el soporte de cada nodo, con 500 réplicas. El consenso de los árboles fue obtenido en Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison, 2010), utilizando la regla mayoritaria al 50%.

4.1.3.3 ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA Y ESTIMACIONES DE TIEMPOS DE DIVERGENCIA

Los árboles de inferencia bayesiana fueron estimados usando el programa BEAST v.1.6.1 (Drummond y Rambaut, 2007). Se realizaron cinco particiones con sus respectivos modelos de evolución: (1) gen 12S, (2) gen 16S, (3) primera posición de los codones del gen ND4, (4) segunda posición de los codones del gen ND4, y (5) tercera posición de los codones del gen ND4. Entre los parámetros que BEAST estima obligatoriamente consta el tiempo de divergencia, el cual puede (con calibración) o no (sin calibración) ser medido en unidades de tiempo. Para estimar este parámetro se escogió el modelo *uncorrelated lognormal*, un tipo de “reloj molecular relajado” que asume tasas independientes en las diferentes ramas del árbol, y no asume una correlación a priori entre la tasa del linaje y la de su ancestro (Drummond, *et al.*, 2007). Al no tener puntos de calibración, se utilizaron calibraciones arbitrarias, las cuales no especifican fechas exactas, pero proveen de información útil acerca de eventos pasados, como por ejemplo, determinan si dos eventos de radiación se suscitaron al mismo tiempo o si un evento de radiación es más antiguo que otro. Se corrieron cuatro análisis independientes por 10 000 000 generaciones cada uno. Se descartan las primeras generaciones porque representan muestras sucesivas no independientes que forman una cadena de Markov, en este caso el primer millón (10%) de generaciones (burn-in) de cada análisis, luego de analizar convergencia y valores adecuados de tamaño efectivo de la muestra (ESS) en el programa TRACER (Drummond, *et al.*, 2007). Así, el árbol final (Maximum Clade Credibility Tree) se elaboró en TreeAnnotator a partir de 36 000 árboles (9 000 de cada análisis).

4.1.4 DISTANCIAS GENÉTICAS

Se empleó el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002) para calcular mediante el criterio de máxima verosimilitud, las distancias genéticas no corregidas del gen mitocondrial 16S. Al obtener estas distancias, se pueden comparar con los umbrales de divergencia genética entre clados hermanos propuestos para este gen (Brown *et al.*, 2002; Fouquet *et al.*, 2007).

4.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS

Para la diagnosis de las cinco especies de *Pholidobolus* se utilizaron los caracteres cualitativos empleados por Montanucci (1973), los cuales están basados en la configuración de las escamas de la cabeza y del párpado inferior, forma de las escamas dorsales, presencia de gránulos laterales y pliegue lateral, presencia de poros femorales y coloración. Se revisaron 210 individuos adultos (109 hembras y 101 machos), 40 pertenecen a *P. affinis* (19 hembras y 21 machos), 40 a *P. annectens* (24 hembras y 16 machos), 86 a *P. macbrydei* (38 hembras y 48 machos), 40 a *P. montium* (25 hembras y 15 machos), y 4 a *P. prefrontalis* (3 hembras y 1 macho). Se consideraron machos adultos aquellos individuos que presentaban madurez sexual, es decir, hemipenes bien formados (SVL 41,3 mm) y hembras adultas si los oviductos estaban circunvalados o poseían huevos (SVL 41,6 mm), basado en lo propuesto para el género *Ptychoglossus* (Harris, 1994). La diferenciación entre sexos estuvo determinada por la presencia de hemipenes en machos y por la coloración de los flancos.

4.2.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS

Se examinaron 11 variables morfológicas cualitativas categóricas (Figura 3) en base a los caracteres empleados en la diagnosis de las 5 especies de *Pholidobolus*. Las variables examinadas fueron: (1) LG = Escamas granulares laterales, 0 = ausencia, 1 = presencia; (2) DSA = Arreglo de escamas dorsales, 0 = imbricadas, 1 = sub-imbricadas, (3) DST = Tipo de escamas dorsales, 0 = quillada o unicarinada, 1 = ligeramente quillada, 2 = estriada, 3 = lisa; (4) DSS = Forma de escamas dorsales, 0 = redondeada, 1 = triangular, 2 = pentagonal, 3 = irregular; (5) DLP = Extensión anterior de la franja dorsolateral, 0 = hasta punta de hocico, 1 = hasta órbita ocular; (6) SL = Franjas en los flancos del cuerpo, 0 = ausencia, 1 = presencia; (7) LEL = Escamas del párpado inferior, 0 = transparente, 1 = opaca; (8) FP = Poros femorales, 0 = ausencia, 1 = presencia; (9) LF = Pliegue lateral, 0 = ausencia, 1 = presencia; (10) OR = Reticulaciones, 0 = ausencia, 1 = presencia; (11) NPF = Escamas prefrontales, 0 = ausencia, 1 = presencia. Se realizó un análisis discriminante en el programa SPSS 17.0 (SPSS, Inc. 2009). Este análisis es un método multivariado que permite discriminar un conjunto de datos, el cual predice y explica la pertenencia de un individuo a un grupo (Pedroza y Dicoovsky, 2006), y se realizó con el fin de identificar las variables más importantes y las más problemáticas en la diferenciación de especies.

4.2.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS

Se examinaron 16 caracteres morfológicos cuantitativos correspondientes a conteos de escamas. Las variables examinadas fueron: (1) NSO = Número de escamas supraoculares; (2) SUJ = Número de escamas de la mandíbula superior, desde el borde anterior del tímpano hasta la punta del hocico; (3) SLJ = Número de escamas de la mandíbula inferior, desde el borde anterior del tímpano hasta la punta del hocico; (4) SGJ = Número de escamas gulares y mandibulares, desde la base del pliegue gular hasta la

punta del hocico; (5) SGV = Número de escamas ventrales, desde la base del pliegue gular hasta el borde anterior de la cloaca; (6) DEL = Número de escamas dorsales, desde el borde posterior del tímpano en línea recta hasta la pata posterior; (7) NTS = Número de escamas temporales, desde el borde posterior de la órbita ocular hasta el borde anterior del tímpano; (8) SAB = Número de escamas alrededor del cuerpo, a la altura de la escama ventral 13; (9) SAT = Número de escamas alrededor de la cola a la altura de la novena escama; (10) SAF = Número de escamas a lo largo de la pata anterior, desde la base del húmero hasta la punta del cuarto dedo; (11) SF3 = Número de escamas del tercer dedo de la pata anterior; (12) SF5 = Número de escamas del quinto dedo de la pata anterior; (13) ST3 = Número de escamas del tercer dedo de la pata posterior; (14) ST4 = Número de escamas del cuarto dedo de la pata posterior; (15) ST5 = Número de escamas del quinto dedo de la pata posterior; (16) LES = Número de escamas del párpado inferior. Los análisis se realizaron en el programa SPSS 17.0 (SPSS, Inc. 2009) y en el programa PAST 2.07 (Hammer *et al.*, 2001). Se evaluó la distribución normal univariada de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la distribución normal multivariada con la prueba de Skewness y Kurtosis, con el fin de cumplir con los requisitos para realizar un MANOVA. Como los datos no se ajustaron a una distribución normal, fueron sometidos a una transformación logarítmica. Sin embargo, luego de la transformación tampoco se ajustaron a una distribución normal. Por ello, en lugar del MANOVA se realizó un análisis de ANOVA no paramétrico (NPMANOVA). Este análisis indica las diferencias significativas entre especies y sexos, pero no cuáles son las variables que influyen en esta diferenciación; para ello se hizo un análisis discriminante. Asimismo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, un método que permite comparar k muestras con el fin de probar si las unidades experimentales son idénticas o no (Anderson *et al.*, 2008; Sánchez, 2010). Esta prueba no paramétrica se realizó con el objetivo de evaluar las relaciones entre cada clado y cada

variable. En estos análisis se excluyó a la especie *P. prefrontalis* ya que al poseer una muestra pequeña ($N = 4$), las pruebas estadísticas tendrían poca potencia para identificar resultados significativos (Fernández, 2009). Para visualizar la correlación entre las variables de *P. prefrontalis* y las variables de los demás clados se hizo un análisis de componentes principales (ACP), un método que permite conocer la máxima variación entre las entidades individuales de muestreo (McGarigal *et al.*, 2000). Finalmente, se realizaron diagramas de caja para los caracteres merísticos: SUJ, SLJ, SGJ, SGV, DEL, NTS, SAB, SAT, SAF y ST4, con el propósito de visualizar la distribución de un conjunto de datos por clado.

4.2.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Se examinaron 17 variables morfométricas, para ello se utilizó un calibrador digital con precisión de 0.01 mm. Las medidas fueron tomadas dos veces en cada espécimen, y de esos valores se calculó un promedio, con el fin de reducir el error humano. Las variables examinadas fueron: (1) SVL = Longitud desde la punta del hocico hasta la base de la cloaca; (2) HW = Ancho de la cabeza a nivel de la articulación mandibular; (3) HT = Alto de la cabeza a nivel de la articulación mandibular; (4) OSL = Longitud desde el borde anterior de la órbita ocular hasta la punta del hocico; (5) OTL = Longitud desde el borde posterior de la órbita ocular hasta el borde anterior del tímpano; (6) TTL = Longitud del tímpano; (7) NL = Longitud entre las dos aberturas nasales; (8) FTL = Longitud desde el pliegue gular hasta el borde posterior del tímpano. (9) HL = Longitud de la cabeza desde el borde anterior del tímpano hasta la punta del hocico; (10) A1 = Longitud del húmero, desde la unión del húmero con el cuerpo hasta la unión del húmero con la ulna; (11) A2 = Longitud de la ulna, desde la unión de la ulna con el húmero hasta la unión de la ulna con la palma; (12) A3 = Longitud de la palma, desde la unión de la palma con la ulna hasta la

unión de la palma con el cuarto dedo; (13) A4 = Longitud del cuarto dedo de la pata anterior, desde la unión del dedo con la palma hasta la punta del dedo; (14) B1 = Longitud del fémur, desde la unión del fémur con el cuerpo hasta la unión del fémur con la tibia; (15) B2 = Longitud de la tibia, desde la unión de la tibia con el fémur hasta la unión de la tibia con la planta; (16) B3 = Longitud de la planta, desde la unión de la planta con la tibia hasta la unión de la palma con el cuarto dedo; (17) B4 = Longitud del cuarto dedo de la pata posterior, desde la unión del dedo con la planta hasta la punta del dedo. Los análisis se realizaron en los programas SPSS 17.0 (SPSS, Inc. 2009) y PAST 2.07 (Hammer *et al.*, 2001). Las pruebas de distribución normal y de diferenciación entre sexos fueron efectuadas como se explicó anteriormente. Al transformar los datos y cumplir con la distribución normal, se obtuvieron los residuales mediante regresiones lineales entre la variable SVL y el resto de variables, con el fin de eliminar el efecto de tamaño. Con esos datos se realizó un análisis multivariado de variancia (MANOVA) para evaluar diferencias significativas entre sexos y clados. Asimismo, se excluyó de estos análisis a la especie *P. prefrontalis* ya que al poseer una muestra pequeña (N = 4), las pruebas estadísticas tendrían poca potencia para identificar resultados significativos (Fernández, 2009). Por lo tanto, para visualizar la correlación entre las variables de *P. prefrontalis* y las variables de los demás clados, se realizó un análisis de componentes principales.

Finalmente, se realizó un ANOVA con la variable SVL para determinar si existen diferencias significativas entre sexos para los cuatro clados (*P. affinis*, *P. annectens*, *P. montium* y *P. macbrydei*). Al encontrar diferencias significativas entre sexos, se realizaron otros análisis de ANOVA para hembras y machos adultos por separado.

4.3 ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

4.3.1 CONSTRUCCIÓN DE RED DE HAPLOTIPOS

Se empleó el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) para estimar la genealogía de los genes mitocondriales ND4, 12S y 16S de la especie *P. macbrydei*, con el objetivo de analizar y comparar geográficamente su estructura poblacional. Se realizó esta red de haplotipos sólo para esta especie, ya que posee la mayor distribución frente a los demás clados y posee sub-clados, de los que se desea obtener datos acerca de su aislamiento. La construcción de la red de haplotipos se basó en el algoritmo de Parsimonia Estadística, que estima el número máximo de diferencias entre haplotipos como resultado de sustituciones simples (Crandall y Templeton, 1993; Posada y Crandall, 2001).

4.3.2 TEST DE MANTEL

Se realizó el test estadístico de la correlación entre dos matrices en el programa Mantel v 1.19 (Cavalcanti, 2008) con el fin de determinar si existe correlación positiva entre las distancias genéticas del gen mitocondrial 16S y las distancias geográficas. De esta manera se puede inferir si las diferencias genéticas se deben al aislamiento por distancia de las poblaciones o existen otros procesos que explican la fragmentación de las poblaciones (Avise, 2000; Pálsson, 2004).

4.3.3 MODELAMIENTO DE NICHOS

El modelamiento de nicho ecológico es una herramienta que permite analizar la asociación entre factores ambientales y distintas poblaciones o especies, de manera que se generan proyecciones geográficas del área potencial que podría ocupar la especie. A partir de eso, es posible calcular el tamaño relativo de las poblaciones, rangos geográficos, sitios idóneos para la supervivencia e identificación de posibles impactos al cambiar los hábitats

(Fielding y Bell, 1997). Para llevar a cabo este análisis, primero se obtuvieron las coordenadas geográficas de las especies identificadas del QCAZ. De igual forma, se obtuvieron datos de localidades de fuentes bibliográficas, al no tener coordenadas geográficas, éstas fueron georeferenciadas en el programa ArcGIS. En el caso de la especie *P. macbrydei* no se tomaron en cuenta los datos de coordenadas de las poblaciones problemáticas. Se escogieron como datos ecológicos las 19 variables bioclimáticas (Tabla 3), las cuales se obtuvieron de Worldclim, con una resolución de 30 arc/sg.

Una vez obtenidas las coordenadas geográficas (173 localidades en total) y las 19 variables bioclimáticas, se empleó el método de máxima entropía en el programa Maxent v.3.3, el cual posee una alta capacidad de predicción y sólo se necesitan los datos de presencia del organismo (Phillips, *et al.*, 2004). El programa Maxent no tomó en cuenta los datos de coordenadas geográficas muy cercanas para la generación de modelos (164 localidades utilizadas). Una vez obtenidos los cinco modelos se escogió el umbral de predicción más bajo asociado a algún dato de presencia, en este caso el umbral percentil 10, ya que identificó el área mínima posible del modelo predicho, lo cual podría considerarse como una aproximación del nicho realizado. Se realizó el análisis del Área Bajo la Curva ROC (AUC), el cual se basa en el remuestreo del total de localidades de colección en grupos de entrenamiento y evaluación, para evaluar la capacidad predictiva de los cinco modelos encontrados. (Tabla 4). Esta prueba determina la habilidad del modelo para predecir las localidades excluidas, donde se calcula un valor de probabilidad p para cada especie. Además por medio de la prueba de Jacknife se pueden estimar las variables climáticas más importantes para la presencia de las especies (Pearson *et al.*, 2007).

Este modelamiento de nichos se realizó con el objetivo de localizar los lugares propicios para la supervivencia y los límites geográficos de las especies del género *Pholidobolus*.

4.3.3.1 ANÁLISIS DISCRIMINANTE

En el programa ArcView GIS v.3.2 se seleccionaron 1 000 puntos al azar de cada modelo predicho para así obtener los datos de las 19 variables bioclimáticas de cada punto. Se realizó un análisis discriminante en el programa SPSS 17.0 (SPSS, Inc. 2009), para estimar las variables que más aportan con la separación de hábitats y rangos geográficos de las cinco especies de *Pholidobolus*.

5. RESULTADOS

5.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS

Se obtuvieron secuencias de 95 individuos con un total de 1531 pares de bases de los genes mitocondriales: 12S (394 pb), 16S (514 pb), y ND4 (623 pb). De los 95 individuos, dos corresponden a los grupos externos: *Cercosaura ocellata* y *Potamites ecpleopus*, pertenecientes a la tribu Cercosaurini de la familia Gymnophthalmidae. De los 1531 caracteres moleculares, 1052 son constantes, 105 son variables no informativos y 374 son variables informativos. El modelo de evolución que se obtuvo para el gen 12S fue Tim3 + I + G, para el gen 16S fue Tim2 + I + G y para el gen ND4 fue GTR + I + G (Tabla 5).

5.1.1 ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA

El análisis de máxima parsimonia para cada gen mitocondrial distingue cuatro grupos monofiléticos correspondientes a *Pholidobolus affinis*, *P. annectens*, *P. montium* y *P. prefrontalis*, y un grupo parafilético perteneciente a *P. macbrydei*. Al existir topologías relativamente congruentes, se combinaron los tres genes mitocondriales (Figura 4).

El árbol filogenético que se obtuvo presenta un valor de soporte de bootstrap de 100 para el clado de *Pholidobolus*. Se distinguen cuatro grupos monofiléticos que corresponden a *Pholidobolus affinis*, *P. annectens*, *P. montium* y *P. prefrontalis* y un grupo parafilético correspondiente a *P. macbrydei*. Un clado representado únicamente por *P. annectens* presenta alto soporte de bootstrap (BP = 100), y es el taxon hermano de un segundo clado representado por las demás especies (*P. affinis*, *P. montium*, *P. prefrontalis* y *P. macbrydei*), el cual presenta también un alto soporte de bootstrap (BP = 91). Dentro del segundo clado, existen dos subclados. El primer subclado está compuesto por el grupo

parafilético *P. macbrydei*, que presenta bajo soporte de bootstrap (BP = 65%). Los individuos encontrados en Jimbura (Loja) son similares morfológicamente a *P. macbrydei*; sin embargo este grupo está fuera de este subclado y se ubica dentro de un segundo subclado con bajo soporte (BP < 50%) compuesto por las especies restantes (*P. affinis*, *P. montium* y *P. prefrontalis*).

En las topologías se pueden observar además delimitaciones geográficas. *P. affinis* se distribuye en las provincias de Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, en los valles centrales del Ecuador. *P. montium* se distribuye en las provincias de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi, es decir desde el límite norte de los valles centrales hasta los valles del norte del Ecuador. *P. prefrontalis* se distribuye en la provincia de Chimborazo, en los valles centrales del Ecuador. *P. macbrydei* se ubica en las provincias de Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay, Loja, Zamora Chinchipe y El Oro. Finalmente, *P. annectens* se encuentra restringido a la provincia de Loja, en los valles del sur del Ecuador.

5.1.2 ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

El análisis de máxima verosimilitud para cada gen mitocondrial identifica cinco clados correspondientes a *Pholidobolus affinis*, *P. annectens*, *P. montium*, *P. prefrontalis*, y *P. macbrydei*. Al existir topologías similares, se combinaron los tres genes mitocondriales.

El árbol filogenético con el mayor valor de verosimilitud para los genes combinados señala en primer lugar que el valor de bootstrap que da soporte a la monofilia de *Pholidobolus* es menor al 50%. Se distinguen cinco clados que corresponden a *Pholidobolus affinis*, *P. annectens*, *P. montium*, *P. prefrontalis* y *P. macbrydei*. La raíz estuvo dada por *Cercosaura ocellata* y *Potamites epleopus* (Figura 5).

La topología del árbol obtenido sugiere nuevamente que las especies de *Pholidobolus* están agrupadas en dos clados. Sin embargo, en contraste con el análisis anterior, ambos clados presentan bajo soporte de bootstrap (BP < 50%). La diferencia más notable entre ambos árboles radica en la topología de los clados. El primer clado está representado por dos especies (*P. affinis* y *P. montium*). El segundo clado está compuesto por dos subclados. El primer subclado está representado por dos especies (*P. annectens* y *P. prefrontalis*), el cual presenta bajo soporte de bootstrap (BP < 50%). El segundo subclado está conformado únicamente por *P. macbrydei*, también con bajo soporte de bootstrap (BP < 50%). Además, los individuos pertenecientes a Jimbura se ubican dentro del clado *P. macbrydei* y ya no se encuentran anidados con *P. affinis* y *P. montium*. A diferencia del árbol de parsimonia, todas las especies de *Pholidobolus* forman grupos monofiléticos cuando los datos son analizados bajo el criterio de máxima verosimilitud.

5.1.3 ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA

El análisis bayesiano para cada gen mitocondrial identifica cinco clados correspondientes a *Pholidobolus affinis*, *P. annectens*, *P. montium*, *P. prefrontalis*, y *P. macbrydei*. Al existir topologías similares, se combinaron los tres genes mitocondriales.

El árbol filogenético obtenido del análisis de inferencia bayesiana para los genes combinados mitocondriales presenta un valor de soporte de bootstrap de 100 para la monofilia del género *Pholidobolus*. Se identifican cinco clados que pertenecen a las cinco especies del género estudiado. El programa BEAST estimó a *Cercosaura ocellata* y *Potamites ecleopus* como los grupos externos (Figura 6). La topología inferida es bastante similar a la observada en el análisis de máxima verosimilitud. Sin embargo, a diferencia del anterior análisis, el primer clado compuesto por *P. affinis* y *P. montium* presenta alto

soporte de bootstrap (BP = 93%). Además, dentro del clado *P. macbrydei* se observa que la población de Guanazán es politómica (Figura 6).

5.1.4 ESTIMACIONES DE TIEMPO DE DIVERGENCIA

El árbol obtenido de este análisis señala que el primer evento de radiación tuvo lugar con el clado de *P. macbrydei*, en dirección de sur a norte, es decir, los eventos de radiación de las provincias de Azuay, Zamora-Chinchipec y Loja fueron más antiguos que los eventos de radiación de las provincias de Cañar, Chimborazo y Tungurahua. El segundo evento de radiación estuvo dado por el clado de *P. affinis* seguido del clado *P. montium*. Finalmente el evento de radiación más reciente estuvo dado por los clados de *P. prefrontalis* y *P. annectens* (Figura 7).

5.1.5 DISTANCIAS GENÉTICAS

En la Tabla 6 se presentan las distancias genéticas del gen mitocondrial 16S entre los cinco clados. El promedio de distancias genéticas entre especies es del 4,6%, siendo *P. annectens* la que en promedio presenta las mayores distancias genéticas con las otras especies (6,8%), donde *P. annectens* y *P. affinis* son las más distantes (7,7%).

Los individuos de *P. annectens* poseen distancias genéticas entre 0 y 3,9%, la mayor distancia genética se debe al aislamiento entre los individuos con QCAZ-R 5528 y 5539 que tienen distribución hacia el lado oriental con el resto de individuos que tienen su distribución hacia el lado occidental de los Andes.

Los individuos de *P. affinis* poseen distancias genéticas pequeñas, entre 0 y 0,6%. Los individuos de Colta (Chimborazo) con QCAZ-R 9899, 9900 y 9901, que se encuentran en el límite sur de la distribución de la especie, presentan en promedio la mayor distancia genética con respecto a las demás poblaciones de *P. affinis*.

Los individuos de *P. montium* poseen distancias genéticas pequeñas entre 0 y 0.8%. Los individuos de Cuicocha (Imbabura) con QCAZ-R 9683, 9685 y 9686, presentan en promedio la mayor distancia genética con respecto a las demás poblaciones de *P. montium*.

Los individuos de *P. prefrontalis* poseen distancias genéticas muy pequeñas entre 0 y 0,6%, debido a su rango geográfico reducido.

Finalmente, se observa que en promedio, las distancias genéticas de *P. macbrydei* son pequeñas (1,9%). Sin embargo, al comparar entre poblaciones, por ejemplo, entre Guanazán y Jimbura se observan distancias genéticas grandes de hasta 5,2% (equiparable a la distancia genética entre dos especies distintas).

5.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS

5.2.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS

En el análisis discriminante para las variables morfológicas cualitativas de machos y hembras adultos, se obtuvieron dos funciones con Eigenvalue > 1 , las cuales explican el 93,7% de la separación entre grupos (Tabla 7). La primera función (F1) está correlacionada positivamente (68,6%) con la presencia o ausencia de gránulos laterales (LG) y la coloración del párpado inferior (LEL); mientras que la segunda función (F2) está correlacionada positivamente (25,1%) con la presencia o ausencia de escamas prefrontales (NPF) y el tipo de escamas dorsales (DST; Tabla 8). La proyección de los individuos sobre las F1 y F2 (Figura 8) permite separar a *P. annectens* de los otros grupos, ya que es el único que tiene las escamas del párpado inferior transparentes y no posee gránulos laterales. Otro grupo que se separa es *P. affinis* ya que posee escamas prefrontales y sus escamas dorsales son quilladas. Por el contrario, las otras tres especies presentan un gran solapamiento, ya que poseen gránulos laterales, las escamas del párpado inferior son opacas y sus escamas dorsales pueden ser ligeramente quilladas, estriadas o lisas. Se

observa además una separación horizontal de los individuos de *P. macbrydei*, esto se debe a la presencia de escamas prefrontales en las poblaciones que pertenecen a las provincias de Cañar, Azuay y El Oro. Los círculos dispersos de *P. montium* y *P. macbrydei* se deben a la variación en el tipo de escamas dorsales. Las predicciones de grupo que se realizaron en el análisis discriminante (Tabla 9) son muy altas para *P. affinis*, *P. annectens*, *P. montium* y *P. prefrontalis*; mientras que las predicciones para *P. macbrydei* son menores al 75%, lo cual se debe a una alta variabilidad intraespecífica.

5.2.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS CUANTITATIVOS

El ANOVA no paramétrico (NPMANOVA) no reveló diferencias significativas entre machos y hembras (Tabla 10), por lo cual ambos sexos fueron analizados en conjunto. Se encontraron diferencias significativas entre los cinco clados (Tabla 11). El análisis discriminante permitió identificar las variables que más aportan con la diferenciación entre clados: número de supraoculares (NSO), número de escamas alrededor de la cola (SAT), número de escamas alrededor del cuerpo (SAB), número de escamas del párpado inferior (LES) y número de escamas a lo largo de la pata anterior (SAF; Tabla 12). El análisis de Kruskal-Wallis reveló que *P. affinis* es la especie que se diferencia más de las otras especies para casi todas las variables, excepto para la variable LES al comparar con *P. macbrydei* y *P. montium*. Entre *P. annectens* y *P. macbrydei* se pueden observar diferencias significativas entre casi todas las variables, excepto NSO, SUJ y SF3. Entre *P. annectens* y *P. montium* no existen diferencias significativas para las variables NSO, SUJ, SGV, DEL y NTS. Finalmente entre *P. macbrydei* y *P. montium* no existen diferencias significativas para las variables NSO, SUJ, SLJ, SAT, SF5, ST4 y LES (Tabla 13)

En el análisis de componentes principales para las variables morfológicas cuantitativas de machos y hembras se obtuvieron dos componentes con Eigenvalue > 1.

Ambos explican el 73,713% de la variación total (Tabla 14). El primer componente (CP1) está correlacionado positivamente (63,241%) con el número de escamas alrededor de la cola (SAT), el número de escamas gulares y mandibulares (SGJ), número de escamas a lo largo de la extremidad anterior (SAF), número de escamas del cuarto dedo de la pata posterior (ST4), número de escamas alrededor del cuerpo (SAB) y número de escamas del tercer dedo de la pata posterior (ST3); mientras que el segundo componente está correlacionado positivamente (10,472%) con el número de escamas del párpado inferior (LES; Tabla 15). La proyección de los individuos sobre el CP1 y CP2 (Figura 9) permite separar a *P. annectens* y *P. affinis* de las demás especies. Se puede observar también que *P. annectens* es la especie con mayor número de escamas frente a los demás clados (Figuras 10, 11, 12, 13 y 14).

5.2.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

El MANOVA reveló diferencias significativas entre hembras y machos (Tabla 16), por lo que se realizaron análisis por separado para cada sexo.

El MANOVA para hembras adultas no reveló diferencias significativas entre clados (Tabla 17). En el análisis de componentes principales para las variables morfométricas de hembras, se obtuvieron dos componentes con Eigenvalue > 1 . Ambos explican apenas el 31,696% de la variación total (Tabla 18). El primer componente (CP1) está correlacionado positivamente (18,898%) con el largo de la cabeza desde el tímpano hasta el hocico (HL) y con el alto de la cabeza (HT); mientras que el segundo componente está correlacionado positivamente (12,798%) con el largo de la tibia-fíbula (B2) y la longitud del húmero (A1; Tabla 19). La proyección de los individuos sobre el CP1 y CP2 (Figura 15) no separa a ningún clado, por lo que las variables morfométricas no explican la variación entre especies.

El MANOVA para machos adultos no reveló diferencias significativas entre clados (Tabla 20). En el análisis de componentes principales para las variables morfométricas de machos, se obtuvieron dos componentes con Eigenvalue > 1 . Ambos explican apenas el 36,327% de la variación total (Tabla 21). El primer componente (CP1) está correlacionado positivamente (21,861%) con el largo de la cabeza desde el tímpano hasta el hocico (HL) y con el largo de la cabeza desde la órbita ocular hasta el hocico (OTL); mientras que el segundo componente está correlacionado positivamente (14,466%) con la longitud del fémur (B1) y la longitud del húmero (A1; Tabla 22). La proyección de los individuos sobre el CP1 y CP2 (Figura 16) no separa a ningún clado, por lo que las variables morfométricas no explican la variación entre especies.

El ANOVA realizado para la variable morfométrica SVL reveló diferencias significativas entre sexos (Tabla 23). El análisis del ANOVA para hembras adultas no reveló diferencias significativas entre clados (Tabla 24). Por otro lado, el análisis de ANOVA para machos adultos reveló diferencias significativas entre *P. affinis* y *P. montium* (Tabla 25). La Figura 17 indica que las hembras tienden a ser más grandes que los machos y señala a su vez que los machos de *P. affinis* son más grandes que los machos de *P. annectens* y *P. montium*.

5.3 ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

5.3.1 CONSTRUCCIÓN DE RED DE HAPLOTIPOS PARA *P. MACBRYDEI*

En la Figura 18 se observa que el haplotipo con QCAZ-R 9626 tiene el mayor peso (0,09) y junto al haplotipo con QCAZ-R 10133 poseen la mayor frecuencia (F=3) dentro de la especie. La distribución de los haplotipos no concuerda en su totalidad con la distribución geográfica, como se puede observar en los haplotipos de Guallicanga (QCAZ-R 10049) y Ozogoche (QCAZ-R 6006), así como en los haplotipos de Pungalá (QCAZ-R

9626) y Tarqui (QCAZ-R 8512). Los haplotipos que pertenecen a Jimbura (6945, 6946, 10054), Cañar (9947, 10051, 10052) y Guanazán (7891, 7894), son muy diferentes a los haplotipos de las demás poblaciones.

5.3.2 TEST DE MANTEL

Se encontró una correlación negativa ($r = -0,007$) y no significativa ($p = 0,4513$) entre la matriz de distancias genéticas del gen mitocondrial 16S y la matriz de distancias geográficas para las cinco especies (Figura 19). De igual manera se encontró una correlación negativa ($r = -0,359$) y no significativa ($p = 1,000$) entre la matriz de distancias genéticas del gen mitocondrial 16S y la matriz de distancias geográficas para la especie *P. macbrydei* (Figura 20).

5.3.3 MODELAMIENTO DE NICHO

El análisis del Área Bajo la Curva ROC (AUC) indica un alto valor predictivo ($p > 0,75$) de los cinco modelos (Tabla 26), es decir, cada modelo tiene la capacidad de predecir mejor de lo que se esperaría al azar ($p < 0,5$). Por lo tanto los modelos son válidos para cada especie. Se observa además en la Tabla 6 que la variable más importante para la preferencia de hábitat de tres especies (*P. affinis*, *P. macbrydei* y *P. prefrontalis*) es la temperatura media del cuatrimestre más cálido

En la Figura 21 se observan las zonas geográficas idóneas para la subsistencia y establecimiento de las especies, obtenidas con los modelos de predicción de nicho. La especie *P. affinis* se ubicaría en los valles centrales del Ecuador (Figuras 21 y 23). *P. annectens* se ubicaría en la zona sur, flancos occidentales y zona norte (provincia de Ibarra; Figura 21). *P. macbrydei* ocuparía la zona sur y centro del Ecuador y los flancos orientales (Figuras 21 y 22). *P. montium* ocuparía los valles centrales y del norte del

Ecuador (Figuras 21 y 22). Finalmente, *P. prefrontalis* ocurriría en los valles centrales y zonas del sur (Figura 21).

5.3.3.1 ANÁLISIS DISCRIMINANTE

En el análisis discriminante para las 19 variables bioclimáticas de las cinco especies de *Pholidobolus* se obtuvieron dos funciones que explican el 82,8% de la separación entre grupos (Tabla 27). La primera función (F1) está correlacionada positivamente (58,9%) con la precipitación del mes más húmedo (BIO13); mientras que la segunda función (F2) está correlacionada negativamente (23,9%) con la estacionalidad de precipitación (BIO15). La proyección de los individuos sobre las F1 y F2 (Figura 24) permite una separación relativa de tres especies (*P. annectens*, *P. macbrydei* y *P. montium*), en la que *P. annectens* se caracteriza por la preferencia de hábitats con mayor precipitación, *P. macbrydei* por hábitats menos estacionales, y *P. montium* por hábitats con menor precipitación en el mes más húmedo. Por otro lado, no existe separación entre *P. affinis* y *P. prefrontalis*, sus preferencias de hábitats se encuentran en su mayoría solapados.

6. DISCUSIÓN

6.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS

El presente estudio es congruente con los límites entre especies de *Pholidobolus* de Ecuador propuestos por Montanucci (1973), aunque *P. macbrydei* podría incluir más de una especie (ver abajo). En este estudio, las tres topologías obtenidas de los análisis de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana identifican cuatro clados con alto soporte estadístico, pertenecientes a *Pholidobolus affinis*, *P. annectens*, *P. montium* y *P. prefrontalis*, y un clado con bajo soporte estadístico perteneciente a *Pholidobolus macbrydei* (Figuras 4, 5 y 6). Cabe decir además que los árboles filogenéticos obtenidos del análisis de máxima parsimonia e inferencia bayesiana presentan el máximo soporte para la monofilia de *Pholidobolus* (Figuras 4 y 6), lo cual es congruente con una filogenia previa de la familia Gymnophthalmidae (Castoe *et al.*, 2004).

Sin embargo, las relaciones de parentesco entre estas cinco especies, establecidas por Hillis (1985) y el presente estudio revelan discrepancias. Hillis (1985) ubica a *P. montium* como taxón hermano de *P. annectens* (Figura 26); ambas especies son las más distantes geográficamente. A pesar de esto, Hillis propone que este parentesco probablemente se debe a que durante el proceso de especiación se suscitaron cambios ambientales abruptos, que afectaron la distribución de las dos especies; como evidencia señala la variación en el rango geográfico entre *P. affinis* y *P. montium* en tan solo una década (Hillis y Simmons, 1986). La naturaleza de estos cambios ambientales abruptos aún no está esclarecida. En contraste, en este estudio, se encontró que *P. montium* es taxón hermano de *P. affinis* (Figuras 5 y 6), este parentesco presenta concordancia geográfica, ambas especies se distribuyen desde los valles centrales hacia el norte del Ecuador (Figura 21).

A pesar de las diferencias mencionadas, la hipótesis de Hillis (1985) y este estudio presentan concordancia al ubicar a *P. annectens* y *P. affinis* como las especies más distantes del árbol filogenético (Figuras 5, 6 y 26). En esta investigación se encontró que las dos especies poseen una divergencia genética de 7,7%. (Tabla 6), la más alta entre los cinco clados. No se conoce con claridad la causa de estas diferencias genéticas.

Cabe finalizar que la hipótesis de filogenia propuesta por Hillis (1985), se basó en datos de aloenzimas, los cuales se conocen que revelan poca variación, además de que estudian solo una parte del ADN: el codificador (Hillis *et al.*, 1996).

6.2 DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

Inicialmente las especies de *Pholidobolus* fueron clasificadas en diferentes géneros, debido a la gran variación morfológica que presentan. *P. montium* (Peters, 1862) constituía la única especie del género *Pholidobolus*, *P. affinis* (Peters, 1862) se consideraba parte del género *Aspidolaemus*, y *P. annectens* (Parker, 1930) pertenecía al género *Macropholidus*. Montanucci (1973) realizó una revisión taxonómica detallada, en la cual sinonimizó a varios géneros con *Pholidobolus* y describió dos nuevas especies: *P. macbrydei* y *P. prefrontalis*. Se basó en características cualitativas (coloración y características discretas) para la identificación de cada especie. Las características cualitativas que propuso para la identificación de cada especie son de gran precisión, como se puede observar en los resultados del análisis discriminante (Figura 8); sin embargo, en el presente estudio se encontró que la característica DLP (extensión anterior de la raya dorsolateral), esencial para discriminar a las hembras de *P. macbrydei* de *P. montium*, no tuvo suficiente peso (Tabla 8), ya que existen muchas hembras de *P. macbrydei* con la extensión de la raya dorsolateral hasta la punta del hocico y no sólo hasta la órbita ocular como lo señaló Montanucci (1973). Esta es una de las primordiales razones por las que en

el centro y sur del Ecuador se confunde a *P. macbrydei* con *P. montium* (e.g., ECOLAP Y MAE, 2007); incluyendo la revisión de Montanucci (1973) que identifica a un individuo de Baños, provincia Tungurahua, como *P. montium*, cuando en realidad es *P. macbrydei*.

Las características merísticas (NSO, SUJ, SLJ, SGJ, DEL, NTS, SAB, SAT, SAF, SF5, ST4, ST5, LES) analizadas por Montanucci (1973) indican solapamiento entre especies, se considera a *P. affinis* como la especie con mayor número de escamas por área del cuerpo y a *P. macbrydei* y *P. annectens* como las especies con el menor número de escamas por área del cuerpo (Figuras 10, 11, 12, 13 y 14). En los presentes análisis se encontraron diferencias significativas entre los clados (Tabla 11, 12 y 13); a pesar de esto, aún se observó solapamiento. Por este motivo, posiblemente el conteo de escamas por sí solo no ayude en la diferenciación de especies, pero puede servir como complemento de las características cualitativas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las hembras de *P. macbrydei* y *P. montium* son aparentemente crípticas en relación a las características cualitativas; pero, podemos diferenciar ambas especies, ya que *P. montium* posee mayor número de escamas gulares (SGJ), escamas alrededor del cuerpo (SAB), escamas a lo largo de la extremidad anterior (SAF) y escamas del tercer dedo de la extremidad posterior (ST3).

Las diferencias en el número de escamas reflejan una reducción en el tamaño relativo de las mismas. Así especies como *P. affinis*, *P. prefrontalis* y *P. montium* que poseen mayor número de escamas mantienen el tamaño del cuerpo similar al de *P. macbrydei* y *P. annectens* que poseen menos escamas. Esto podría tener un efecto en la adaptación de las especies al ambiente, como lo menciona Montanucci; especies como *P. affinis* que viven en zonas más secas, reducen el tamaño de las escamas para disminuir la superficie cutánea, de manera que exista menor pérdida de agua. Esto también se ha observado en *Anolis oculatus* (Malhotra & Thorpe, 1991).

Por otro lado, la mayoría de las características morfométricas no presentaron diferencias significativas entre especies, lo que nos sugiere que la forma y tamaño del cuerpo no son rasgos adaptativos al ambiente, tomando en cuenta que tres de las cinco especies (*P. annectens*, *P. macbrydei* y *P. montium*) ocupan un nicho ecológico diferente (Figuras 21 y 22). La única diferencia significativa se encontró en la variable SVL entre *P. affinis* y *P. montium*.

6.2.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL

El dimorfismo sexual entre los clados está dado por la coloración (detallada por Montanucci) y las características morfométricas. Resulta interesante encontrar que la forma y largo del cuerpo no presentan diferencias significativas entre clados y sí entre sexos. Las hembras tienden a ser más largas que los machos (Figura 17). Estudios señalan que presiones selectivas que actúan sobre el tamaño corporal materno pueden estar involucradas en aumentar la capacidad reproductiva, es decir, en la producción de una mayor cantidad de huevos (Stuart-Smith *et al.*, 2007). Por otro lado, la forma de la cabeza de los machos y las extremidades tienden a ser más grandes que las de las hembras. Algunas hipótesis (Kratochvíl *et al.*, 2003) que se han propuesto están relacionadas con la selección sexual y/o la selección natural; en la que cabezas más grandes y alargadas pueden conducir a una divergencia en la obtención de recursos alimenticios, o sirven en las peleas entre machos para ganar y así copular con la hembra; en el caso de las extremidades largas, éstas podrían cambiar la posición del centro de gravedad del cuerpo, confiriendo una locomoción más eficaz (Kratochvíl *et al.*, 2003). De esta manera, se pueden inferir dos aspectos: el primero que señala que pueden actuar diferentes presiones selectivas para la evolución dimórfica del tamaño y forma del cuerpo, y el segundo que señala que estas

fuerzas selectivas reflejan adaptaciones para diferentes funciones ecológicas, etológicas o reproductivas (Butler & Losos, 2002; Kratochvíl *et al.*, 2003).

6.3 FILOGEOGRAFÍA

6.3.1 LÍMITES DE ESPECIES

En el presente estudio se encontró que los datos filogenéticos, morfológicos y ecológicos sirven como evidencias que permiten una mejor delimitación de especies. Estos tres grupos de datos permiten profundizar sobre procesos de especiación y origen del género *Pholidobolus*.

Los resultados filogenéticos y morfológicos nos indican en su mayoría que las especies poseen distancias genéticas grandes (4,6% en promedio; Tabla 6) y suficiente divergencia morfológica (Figuras 7 y 8), lo que las hace fácilmente diferenciables.

Al analizar el resultado del análisis discriminante de los puntos extraídos del modelo predictivo asociado a las 19 variables bioclimáticas (Figura 24), se identificaron algunas preferencias de hábitat específicas, como áreas con poca precipitación (*P. affinis*, *P. montium* y *P. prefrontalis*) o áreas con mayor precipitación (*P. macbrydei* y *P. annectens*). Dentro del segundo grupo, *P. macbrydei* es la única dentro del género con poblaciones en hábitats con menor estacionalidad, lo que representaría los flancos orientales del Ecuador (Figura 24). Por otro lado, *P. annectens* se encuentra dividida en dos grupos: poblaciones occidentales (hábitats con mayor estacionalidad) y poblaciones orientales (hábitats con menor estacionalidad), distintas genética y ambientalmente (Tabla 6; Figura 25), lo que nos sugiere diferenciación ecológica que podría conferir en el presente o en un futuro aislamiento reproductivo (Schluter, 2009).

Aún cuando los límites de estas especies parecen estar completamente resueltos, se han encontrado algunas particularidades interesantes, ya sea por su similar apariencia o por

su interacción. Uno de estos casos se presenta entre *P. montium* y *P. macbrydei*, en la que sus geográficos y requerimientos ambientales no son completamente claros, ambos presentan poca diferenciación morfológica (hembras) y poca diferenciación genética (2,8%; Tabla 5), a pesar de no ser taxa hermanos (Figuras 5 y 6). A pesar de esto, ambas especies poseen distintos rangos de distribución según los mapas de predicción de nicho (Figura 23). Así, el límite sur del rango de distribución de *P. montium* se encuentra en la provincia de Cotopaxi (Figura 23), y el límite norte del rango de distribución de *P. macbrydei* se ubica en la provincia de Tungurahua (Figura 23); de esta manera el hábitat que ocupan estas especies no se solapa.

Por otro lado, los límites de especies dentro del clado *P. macbrydei* tampoco están claros, ya que se evidencian tres grupos con haplotipos muy distintos (Figura 18), que a su vez poseen distancias genéticas grandes. Por ejemplo, entre las poblaciones de Guanazán y Jimbura se observan distancias genéticas grandes de hasta 5,2% (equiparable a la distancia genética entre dos especies distintas; Tabla 6). Según Fouquet *et al.* (2007), un umbral de divergencia de 3% para el gen mitocondrial 16S en anfibios es suficiente para separar poblaciones en diferentes especies. Según Brown *et al.* (2002), un umbral de divergencia del 2,6% para el gen mitocondrial 16S en lagartijas podría ser suficiente para separar poblaciones en diferentes especies, tomando en cuenta varias evidencias geográficas y ecológicas. Bajo esta premisa, se podría considerar a la población de Jimbura (distancias genéticas con otras poblaciones entre 2.6-4.5%; Anexo 1, Figuras 2, 4, 5 y 6) como posible nueva especie; sin embargo presenta conservativismo morfológico (Figura 27) y ocupa hábitats similares a las otras poblaciones de *P. macbrydei* (Figura 23). Por ello, se prefiere designar a este grupo como una Unidad Evolutiva Significativa (UES), que se define como un grupo de organismos que han estado aislados de otros grupos de la misma especie por un periodo de tiempo suficiente para haber desarrollado divergencias genéticas

significativas entre ellas (Eguiarte *et al.*, 2007). El caso de la población de Guanazán (distancias genéticas con otras poblaciones entre 2.8-5.2%; Anexo 1, Figuras 2, 4, 5 y 6) es similar al anterior, excepto que sí existen diferencias morfológicas (Figura 27); de todas maneras, en la topología de inferencia bayesiana (Figura 6) se observa que no existe una separación evidente de esta población con otras poblaciones de *P. macbrydei*. Por lo tanto, este grupo podría considerarse también como una Evolutiva Significativa (UES). Ahora, el caso más complejo lo representan las poblaciones (QCAZ-R 9947, 10051, 10052) de la provincia de Cañar (Anexo 1, Figuras 2, 4, 5 y 6). Genéticamente presentan distancias menores (2.8-3.7%) con otras poblaciones de *P. macbrydei* que los grupos mencionados anteriormente; sin embargo presenta grandes variaciones morfológicas con respecto a otras poblaciones de *P. macbrydei* (Figura 27). De hecho, sus características morfológicas son idénticas a la de poblaciones de *P. prefrontalis*, además de que el hábitat en donde se les encontró es semiárido, zonas exclusivas en esa provincia de la especie *P. prefrontalis*. Más aún, a unos cuatro kilómetros aproximadamente, se encontró un individuo (QCAZ-R 10050) identificado como *P. macbrydei* que morfológica (Figura 27) y genéticamente (Figuras 4, 5 y 6) es muy distinto de estas poblaciones señaladas. Sumado a estos hechos, se han reportado posibles zonas de simpatria entre estas dos especies (Montanucci, 1973), lo que generaría una mayor probabilidad de interacción entre ellas. Ante estas evidencias, se sugiere que estas poblaciones de Cañar son resultado de eventos de introgresión, es decir, dispersión natural de los genes de una especie a otra como consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica seguido de retrocruzamientos sucesivos con los progenitores recurrentes (Eguiarte *et al.*, 2007). Al mismo tiempo, se sugiere que al no encontrarse la presencia de *P. macbrydei* o *P. prefrontalis* en esa área, estas poblaciones probablemente generaron cierta estabilidad, donde si sus recombinantes presentan gran viabilidad y fertilidad que les permita sobrevivir en ese ambiente, podrían ser capaces de

aislarse reproductivamente de ambos padres y ser entidades distintas (Dowling & Secor, 1997). De todas maneras, se debe realizar un estudio con ADN nuclear, fundamental para esclarecer estos patrones.

Otro caso peculiar, se observa en *P. prefrontalis* y *P. affinis*, las cuales poseen sitios idóneos de supervivencia solapados en casi su totalidad. El modelo predicho para *P. prefrontalis* ocurriría en el área donde habita actualmente *P. affinis* (Figura 22). Probablemente, las poblaciones de *P. affinis* están limitando la distribución de *P. prefrontalis* hacia el norte (provincia Tungurahua), impidiendo de esta manera que esta especie ocupe todo su nicho fundamental.

Finalmente, otro caso especial se presenta entre *P. affinis* y *P. montium* en el área de Mulaló, reportada como zona de simpatria en 1973 (Montanucci, 1973), que a su vez representan los límites de distribución para las especies *P. affinis* y *P. montium* (Figura 21); Hillis & Simmons (1986) en 1984 encontraron en esta localidad únicamente a *P. montium*, por lo que dedujeron que el cambio dramático inducido por el ser humano (eliminación de rocas, plantaciones e intensa irrigación) le confirió mayor ventaja adaptativa a *P. montium*, ya que tiene mayor tolerancia a la humedad, desplazando a *P. affinis* hacia el sur. Sin embargo, en el año 2009 que se visitó el área, se encontró tan sólo un individuo de *P. montium*. La zona se encontraba fuertemente erosionada, las plantaciones mayoritarias correspondían a eucaliptos y pinos que se sabe absorben gran cantidad de agua y disminuyen la humedad de los suelos (Hofstede et al., 2002). En este contexto, se deduce que las actividades antropogénicas alteran el hábitat, lo que podría causar una disminución del rango geográfico de la especie y en casos extremos su extinción (Sala et al., 2000).

6.3.2. PATRONES DE DIVERSIFICACIÓN

Las relaciones filogenéticas y las distribuciones longitudinales en los Andes del Ecuador del género *Pholidobolus*, sugieren un patrón de especiación que se generó con el levantamiento de la Cordillera de los Andes del Norte. Según los datos de este estudio se descarta que los eventos de especiación puedan deberse al aislamiento por distancia de las poblaciones (Figuras 19 y 20), y se propone más bien eventos de especiación parapátrica y ecológica.

Los Andes comenzaron a elevarse en el Cretácico tardío hace 60 millones de años, la mayor orogénesis ocurrió en el Mioceno hace 14 millones de años, en la que las regiones lograron exceder los 1000 metros de altura (Koscinski *et al.*, 2008). Una vez que las montañas comenzaron a elevarse, los hábitats de zonas altas estuvieron disponibles para la colonización y dado que el levantamiento de los Andes del Norte fue de sur a norte, se esperaría que la disponibilidad de estos hábitats tuviera el mismo patrón (Doan, 2003).

Según las estimaciones de tiempo de divergencia, el primer evento de radiación tuvo lugar con el clado de *P. macbrydei* (Figura 7). Se sugiere que la adaptación local causó separación altitudinal (actualmente ocupan los hábitats más altos, hasta 3962 metros) con el resto de poblaciones, y como consecuencia de acumulación de diferencias genéticas, pudo eventualmente dividirse en grupos reproductivamente aislados, generándose así, especiación parapátrica (Gavrilets *et al.*, 2000).

Por otro lado, poblaciones ancestrales que migraron más hacia el norte, dieron origen al segundo evento de radiación, representado por *P. affinis* y *P. montium* (Figura 7). Al no existir barreras geográficas evidentes y al encontrar que estas especies ocupan nichos distintos (Figuras 21 y 24), se sugiere que el evento de especiación es consecuencia de la adaptación a distintas condiciones ambientales de la época, por ejemplo en los periodos interglaciales las zonas altoandinas eran áridas y las zonas más bajas húmedas (Simpson,

1975). Esta especiación ecológica pudo conducir a la evolución de cualquier tipo de aislamiento reproductivo, incluyendo aislamiento precigótico, esterilidad del híbrido e inviabilidad del mismo (Schluter, 2009). De esta manera, *P. affinis* permaneció en las zonas secas de los valles centrales (Figura 21) y *P. montium* en zonas relativamente más húmedas de los valles del norte (Figura 21). Se ha identificado además, que la posible barrera geográfica que impide la migración de *P. montium* hacia el norte de la provincia de Ibarra, está dada por los profundos valles áridos del Río Chota-Mira (Parsons, 1982). Se ha visto que esta barrera también juega un rol importante en la diversificación de *Osornophryne* (Páez, 2010) y de carábidos (Moret, 2005). Sin embargo, existe un registro de *P. montium* en el sur de Colombia (Reeder, 1996) que ha sido el único reporte desde 1975 hasta la fecha. Sin embargo, se observa en la Figura 23 que la zona sur de Colombia posee los requerimientos adecuados para la supervivencia de esta especie. Por lo tanto existen dos posibilidades, la primera que sea a un error de identificación y la segunda que la migración hacia el norte de *P. montium* ocurrió por los flancos orientales

Finalmente, el tercer evento de radiación y el más reciente pertenece a los clados de *P. annectens* y *P. prefrontalis* (Figura 7). Se esperaría que estos clados que actualmente se distribuyen en el sur y valles centrales del Ecuador respectivamente (Figura 21), divergieran primero que el resto de clados dado el patrón de levantamiento de los Andes. Sin embargo, los Andes no son una entidad simple que se elevó de forma instantánea, existieron variaciones altitudinales y longitudinales (Torres-Carvajal & de Queiroz, 2009). Además, las áreas meridionales son poco conocidas (Moret, 2005), por lo que no se sabe con certeza los eventos que se suscitaron en esta área. Se sugiere que poblaciones ancestrales de *P. annectens* ocuparon zonas sub-húmedas en los periodos interglaciales (Simpson, 1975), donde se adaptó localmente a áreas con rangos altitudinales de 2150 a 2335 metros y poblaciones ancestrales de *P. prefrontalis* ocuparon áreas semiáridas

(Simpson, 1975) en áreas con rangos altitudinales de 2400 a 2885 metros. Esta especiación parapátrica pudo ser influenciada a la vez por fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, en la que periodos interglaciares redujeron tamaño poblacional y propiciaron el aislamiento y la diferenciación de estas poblaciones (Koscinski *et al.*, 2008; Simpson, 1979), restringiendo a *P. annectens* a la provincia de Loja. Posibles migraciones posteriores pudieron ser limitadas por la presencia de dos zonas áridas en la provincia de Loja, una en el valle de Jubones y otra en el valle de Catamayo (Moret, 2005).

6.4 CONCLUSIONES

En base a todas las evidencias presentadas, se reconocen cinco especies dentro del género *Pholidobolus*, congruente con lo propuesto por Montanucci (1973), las cuales tienden a ocupar ambientes y rango geográficos relativamente distintos (excepto *P. affinis* y *P. prefrontalis*). Sin embargo, se sugiere que el clado *P. macbrydei* probablemente es parte de un complejo de especies, con poblaciones en proceso de especiación, al encontrarse evidencias genéticas y morfológicas. Además se reconoce poco aislamiento reproductivo precigótico entre las poblaciones de la zona centro-sur del Ecuador (provincia de Cañar) de las especies *P. macbrydei* y *P. prefrontalis*, al identificar un posible caso de hibridación. Se recomienda realizar estudios con ADN nuclear.

De acuerdo a los eventos de radiación mencionados anteriormente, se considera la especiación parapátrica y ecológica como las formas dominantes de diversificación del género *Pholidobolus*, no la alopátrica como comúnmente se observa (Aguar *et al.*, 2009). Además, se señala que los procesos de diversificación son complejos y heterogéneos, que dependen de factores geológicos, geográficos, climáticos y de interacciones bióticas. Por ello, no se puede asumir una hipótesis simple que explique los patrones de especiación en los Andes (e.g. Doan, 2003; Torres-Carvajal, 2007).

Por otro lado, la adecuada delimitación de estas especies es elemental para la conservación de sus hábitats. Además, con la obtención de datos de rangos geográficos y ecológicos se pueden establecer áreas prioritarias para la supervivencia de este grupo.

7. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M.A., Baranger, M., Baptestini, E.M., Kaufman, L. y Bar-Yam, Y. 2009. Global patterns of speciation and diversity. *Nature* 46 (7253): 384-387
- Albert, J.S. y Crampton, W.G. 2010. The geography and ecology of diversification in neotropical freshwaters. *Nature Education Knowledge* 1 (10): 13
- Anderson, D., Sweeney, D. y Williams, T. 2008. Estadística para administración y economía. 10ma edición. Cengage Learning Editores, S.A., México.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Massachusetts.
- Biomatters, Ltd. 2005-2010. Geneious Basic v.5.1.4.
- Brown, R.P., Suárez, N.M. y Pestano, J. 2002. The atlas mountains as a biogeographical divide in north-west Africa: evidence from mtDNA evolution in the agamid lizard *Agama impalearis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24 (2): 324-332
- Bull, C.M. 1991. Ecology of parapatric distributions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 19-36
- Butler, M. y Losos, J. 2002. Multivariate sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in greater antillean *Anolis* lizards. *Ecological Monographs* 74 (4): 541-559

- Castoe, T.A., Doan, T.M. y Parkinson, C.L. 2004. Data partitions and complex models in bayesian analysis: The phylogeny of Gymnophthalmid lizards. *Systematic Biology* 53 (3): 448-469
- Cavalcanti, M. 2008. Program for Mantel test. version 1.19. Centro de Ciencias Biológicas, Universidad de Santa Úrsula.
- Chesser, T. 2000. Evolution in the High Andes: The Phylogenetics of *Muscisaxicola* Ground-Tyrants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15 (3): 369-380
- Clement M, Posada D y Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660
- Crandall, K.A. y Templeton, A.R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969
- de Queiroz, K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (1): 6600-6607
- Doan, T. 2003. A south-to-north biogeographic hypothesis for Andean speciation: evidence from the lizard genus *Proctoporus* (Reptilia, Gymnophthalmidae) *Journal of Biogeography* 30 (3): 361-374

- Dowling, T.E. y Secor, C.L. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 593-619
- Drummond, A. y Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214
- Drummond, A., Ho, S., Rawlence, N. y Rambaut, A. 2007. A rough guide to BEAST 1.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh
- Duellman, W.E. 1979. The herpetofauna of the Andes: Patterns of distribution, origin, differentiation and present communities. En: *The South American herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal*, Monograph 7, W. E. Duellman (ed.) pp. 371-459. University of Kansas Natural History Museum Lawrence, Kansas
- ECOLAP y MAE, 2007. Guía del Patrimonio de áreas Naturales Protegidas del Ecuador. ECOFUND, FAN, DarwinNet, IGM, Quito, Ecuador
- Edgar, R. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792-1797
- Edgar, R. y Batzoglou, S. 2006. Multiple sequence alignment. *Current Opinion in Structural Biology*, 16: 368-373

- Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT. México, D.F.
- Fernández, A. 2009. Técnicas de análisis multivariante aplicadas al turismo. Canales 7 Servicios Editoriales, S.L.
- Fielding, A.H. y Bell, J.F. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation* 24 (1): 38–49
- Fouquet, A., Vences, M. Salducci, M., Meyer, A. Marty, C., Blanc, M. y Gilles, A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43 (2): 567-582
- Gavrilets, S., Li, H. y Vose, M.D. 2000. Patterns of Parapatric Speciation. *Evolution* 54 (4): 1126-1134
- Gómez, M. y Little, A. 1981. Geocology of the Andes. The natural science basis for research planning. *Mountain Research and Development* 1 (2): 115-144
- Graham, A. 2009. The Andes: A geological overview from a biological perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96 (3): 371-385
- Graham, C., Ron, S., Santos, J., Schneider, C. y Moritz, G. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution*, 58(8): 1781-1793

- Gregory-Wodzicki, K. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* 112 (7): 1091-1105
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T y Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4 (1): 9.
- Harris, D. 1994. Review of the Teiid lizard genus *Ptychoglossus*. *Herpetological Monographs* 8: 226-275
- Hillis, D. 1985. Evolutionary genetics of the andean lizard genus *Pholidobolus* (Sauria: Gymnophthalmidae): Phylogeny, Biogeography, and a comparison of tree construction techniques. *Systematic Zoology* 34 (2): 109-126
- Hillis, D.M. y Simmons, J.E. 1986. Dynamic change of a zone of parapatry between two species of *Pholidobolus* (Sauria: Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology* 20 (1): 85-87
- Hillis, D.M., Mortiz, C. y Mable, B. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Hofstede, R.G. Groenendijk, J.P., Coppus, R., Fehse, J.C. y Sevink, J. 2002. Impact of pine plantations on soils and vegetation in the Ecuadorian high Andes. *Mountain Research Development* 22 (2): 159-167

- Howes, B., Lindsay, B. y Loughheed, S. 2006. Range-wide phylogeography of a temperate lizard, the five-lined skink (*Eumeces fasciatus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 183-194
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. y Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30 (4): 3059-3066
- Katoh, K. y Toh, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9 (4): 286-298
- Koscinski, D., Handford, P., Turbaro, P., Sharp, S. y Loughheed, S. 2008. Pleistocene climate cycling and diversification of the Andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. *Molecular Ecology* 17 (8): 2012-2025
- Kratochvíl, L., Fokt, M., Reháč, I. y Frynta, D. 2003. Misinterpretation of character scaling: a tale of sexual dimorphism in body shape of common lizards. *Canadian Journal Zoology* 81: 1112-1117
- Lemey, P., Salemi, M. y Vandamme, A. (eds) 2009. *The phylogenetic handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press, New York, U.S.A.
- Maddison, W. y Maddison, D. 2010. *Mesquite: A modular system for evolutionary analysis*, v.2.74

- Malhotra, A. y Thorpe, E.S. 1991. Microgeographic variation in *Anolis oculatus*, on the island of Dominica, West Indies. *Journal of Evolutionary Biology* 4 (2): 321-335
- McGarigal, K. Cushman, S. y Stafford, S. 2000. *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*. Springer, New York.
- Montanucci, R. 1973. Systematics and evolution of the andean lizard genus *Pholidobolus* (Sauria: Teiidae). University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication 59: 1-52
- Moret, P. 2005. Los coleópteros Carabidae del páramo en los Andes del Ecuador. Sistemática, Ecología y Biogeografía. Tesis de Doctorado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador
- Navas, C. 2006. Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: Insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integrative and Comparative Biology* 46 (1): 82-91
- Páez, D. 2010. Diversidad y especiación en los sapos andinos del género *Osornophryne* (Anura: Bufonidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador
- Pálsson, S. 2004. Isolation by distance, based on microsatellite data, tested with spatial autocorrelation (SPAIDA) and assignment test (SPASSING). *Molecular Ecology Notes* 4 (1): 143-145.

- Parker, H. 1930. Two new reptils from southern Ecuador. *Annals and Magazine of Natural History* 10 (5): 568-571
- Parsons, J.J. 1982. The northern Andean environment. *Mountain Research and Development* 2 (3): 253-264
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M. y 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 (1): 102–117
- Pedroza, H. y Dicovsky, L. 2006. Sistema de análisis estadístico con SPSS. IICA, Nicaragua.
- Pellegrino, K.C., Rodrigues, M.T., Yonenaga-Yassuda, Y. y Sites, J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of the Linnean Society* 74 (3): 315-338
- Peters, W. 1862. Über *Cercosaura* und die mit dieser Gattung verwandten Eidechsen aus Südamerica. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften*. Berlin 165-225
- Peterson, A. 2001. Predicting species geographic distributions based on ecological niche modeling. *The Cooper Ornithological Society* 103 (3): 599-605

- Phillips, S., Dudik, M. y Schapire, R. 2004. A maximum entropy approach to species distribution modeling. En Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning, pp. 655-662
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256
- Posada D y Crandall KA. 2001. Intraspecific phylogenetics: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (1): 37-45
- Reeder, T. 1996. A new species of *Pholidobolus* (Squamata: Gymnophthalmidae) from the Huancabamba depression of Northern Peru. *Herpetologica* 52 (2): 282-289
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. y Wall, D.H. 2000. Biodiversity – global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770–1774.
- Sánchez, J. 2010. Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Schluter, D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323 (5915): 737-740.

- Simpson, 1975. Pleistocene changes in the flora of the high tropical Andes. *Paleobiology* 1 (3):273-294
- Simpson, B., 1979. Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. En: *The South American herpetofauna: Its origin, evolution, and dispersal*, W. E. Duellman (ed.) pp 157-188. University of Kansas Natural History Museum Monograph 7, Lawrence, Kansas, U.S.A.
- Smith, E. y Gutberlet, R. 2001. General Frequency Coding: A method of preparing polymorphic multistate characters for phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 50 (2): 156-169
- SPSS, Inc. 2009. SPSS for Windows, release 17.0. SPSS Inc., Chicago, U.S.A.
- Stuart-Smith, J., Swain, R., Stuart-Smith, R y Wapstra E. 2007. Is fecundity the ultimate cause of female-biased size dimorphism in a dragon lizard? *Journal of Zoology* 273 (3): 266-272
- Swofford, D. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) 4.0 Beta. Sinauer Associates, Inc.
- Torres-Carvajal, O. 2000-2009. Reptiles de Ecuador: lista de especies y distribución. Amphisbaenia y Sauria. [en línea]. Ver. 1.1. 25 Mayo 2000. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/reptiliawebec/reptilesecuador/index.html>> [Consulta: 12 de enero del 2011]

- Torres-Carvajal, O. 2007. Phylogeny and biogeography of a large radiation of Andean lizards (*Iguania*, *Stenocercus*). *Zoologica Scripta* 36: 311-326
- Torres-Carvajal, O. y de Queiroz, K. 2009. Phylogeny of hoplocercine lizards (Squamata: *Iguania*) with estimates of relative divergence time. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 31-43
- Valencia, J.H., Toral, E., Morales, M., Betancourt, R. y Barahona, A. 2008. Guía de campo de reptiles del Ecuador. Fundación Herpetológica Gustavo Orcés, Simbioe, Quito, Ecuador
- Veblen, T. Young, K. y Orme, A. (eds) 2007. *The physical geography of South America*. Oxford University Press, Inc., New York, U.S.A.
- Vitt, L. y Caldwell, J. 2009. *Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles*. Tercera edición. Elsevier Inc., Massachusetts, U.S.A.
- Wiens, J. 2001. Character analysis in morphological phylogenetics: problems and solutions. *Systematic Biology* 50 (5): 689-699
- Wiens, J. 2004. What is speciation and how should we study it? *The American Naturalist* 163 (6): 914-923
- Zwickl, D. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Tesis de Doctorado, University of Texas, Austin, U.S.A.

8. FIGURAS

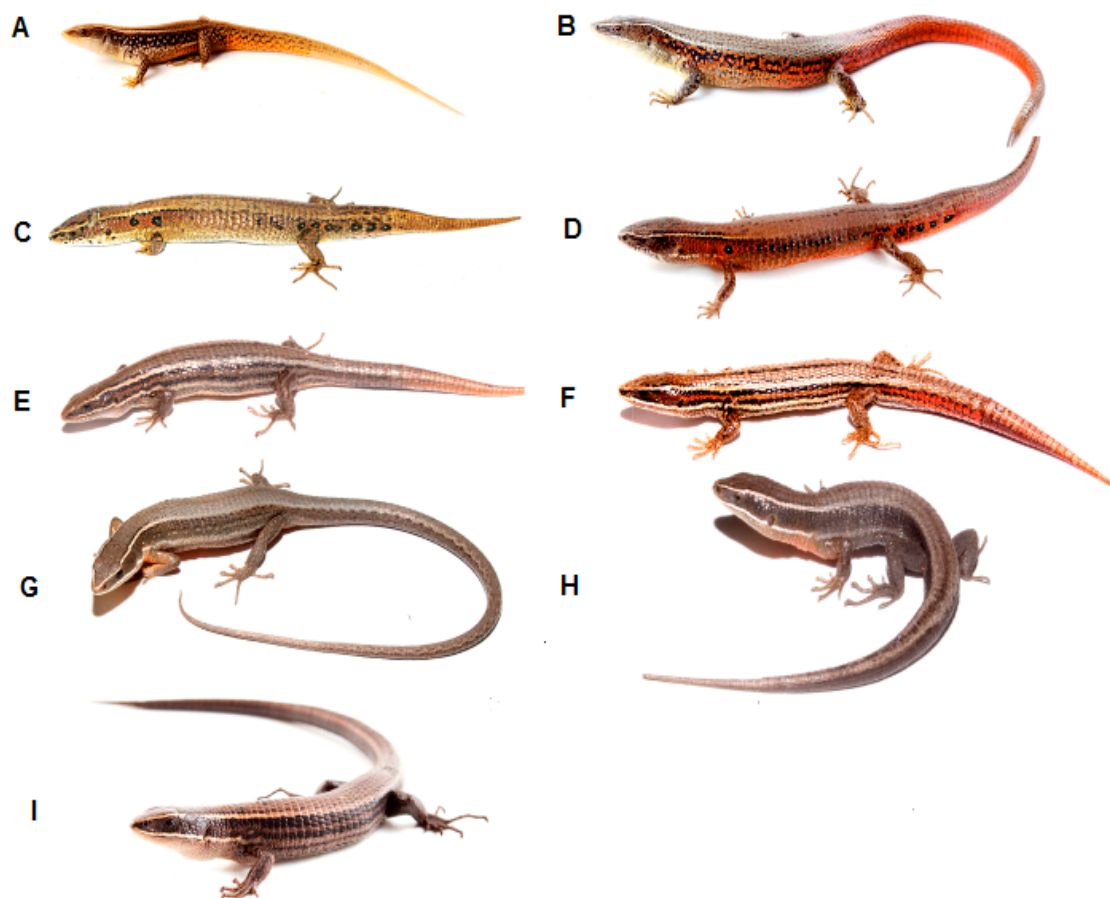


Figura 1. Fotografías de las cinco especies de *Pholidobolus*. *P. affinis* (A=hembra, QCAZ-R 9849; B=macho, QCAZ-R 9998). *P. annectens* (C=hembra, QCAZ-R 10293; D=macho, QCAZ-R 10316). *P. macbrydei* (E=hembra, QCAZ-R 10020; F=macho, QCAZ-R 9932). *P. prefrontalis* (G=hembra, QCAZ-R 9909; H=macho, QCAZ-R 9908). *P. montium* (I=hembra, QCAZ-R 8057). Fotografías: Omar Torres-Carvajal (A, C, D, E, F, G, H, I) y Silvia Aldás (B).

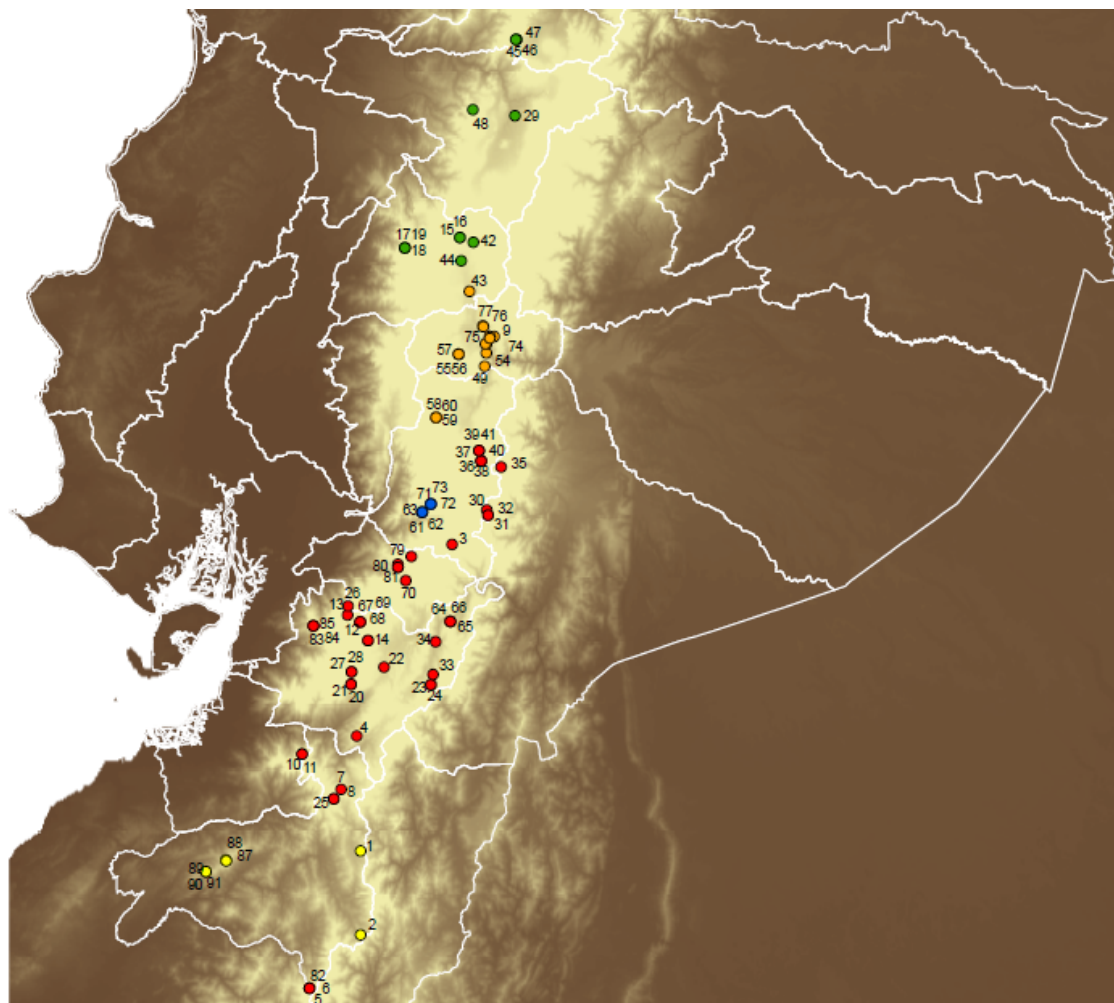


Figura 2. Mapa de las localidades visitadas en el presente estudio. Los números hacen referencia a las localidades de los 91 individuos secuenciados de las cinco especies de *Pholidobolus* (Anexo 1). Los círculos verdes representan a *P. montium*, los círculos tomates a *P. affinis*, los círculo azules a *P. prefrontalis*, los círculos rojos a *P. macbrydei* y los círculos amarillos a *P. annectens*.

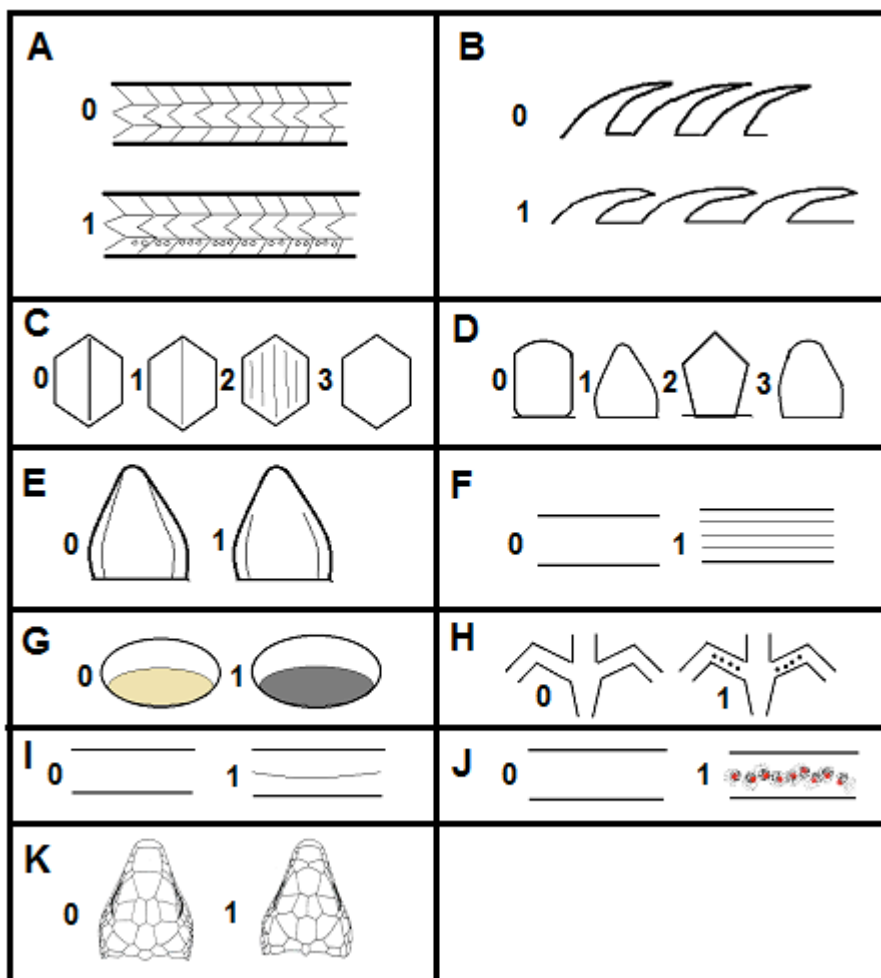


Figura 3. Variables morfológicas cualitativas de *Pholidobolus*. (A) LG = Escamas granulares laterales, 0 = ausencia, 1 = presencia; (B) DSA = Arreglo de escamas dorsales, 0 = imbricadas, 1 = sub-imbricadas, (C) DST = Tipo de escamas dorsales, 0 = quillada o unicarinata, 1 = ligeramente quillada, 2 = estriada, 3 = lisa; (D) DSS = Forma de escamas dorsales, 0 = redondeada, 1 = triangular, 2 = pentagonal, 3 = irregular; (E) DLP = Extensión anterior de la franja dorsolateral, 0 = hasta punta de hocico, 1 = hasta órbita; (F) SL = Franjas en los flancos del cuerpo, 0 = ausencia, 1 = presencia; (G) LEL = Escamas del párpado inferior, 0 = transparente, 1 = opaca; (H) FP = Poros femorales, 0 = ausencia, 1 = presencia; (I) LF = Pliegue lateral, 0 = ausencia, 1 = presencia; (J) OR = Reticulaciones, 0 = ausencia, 1 = presencia; (K) NPF = Escamas prefrontales, 0 = ausencia, 1 = presencia.

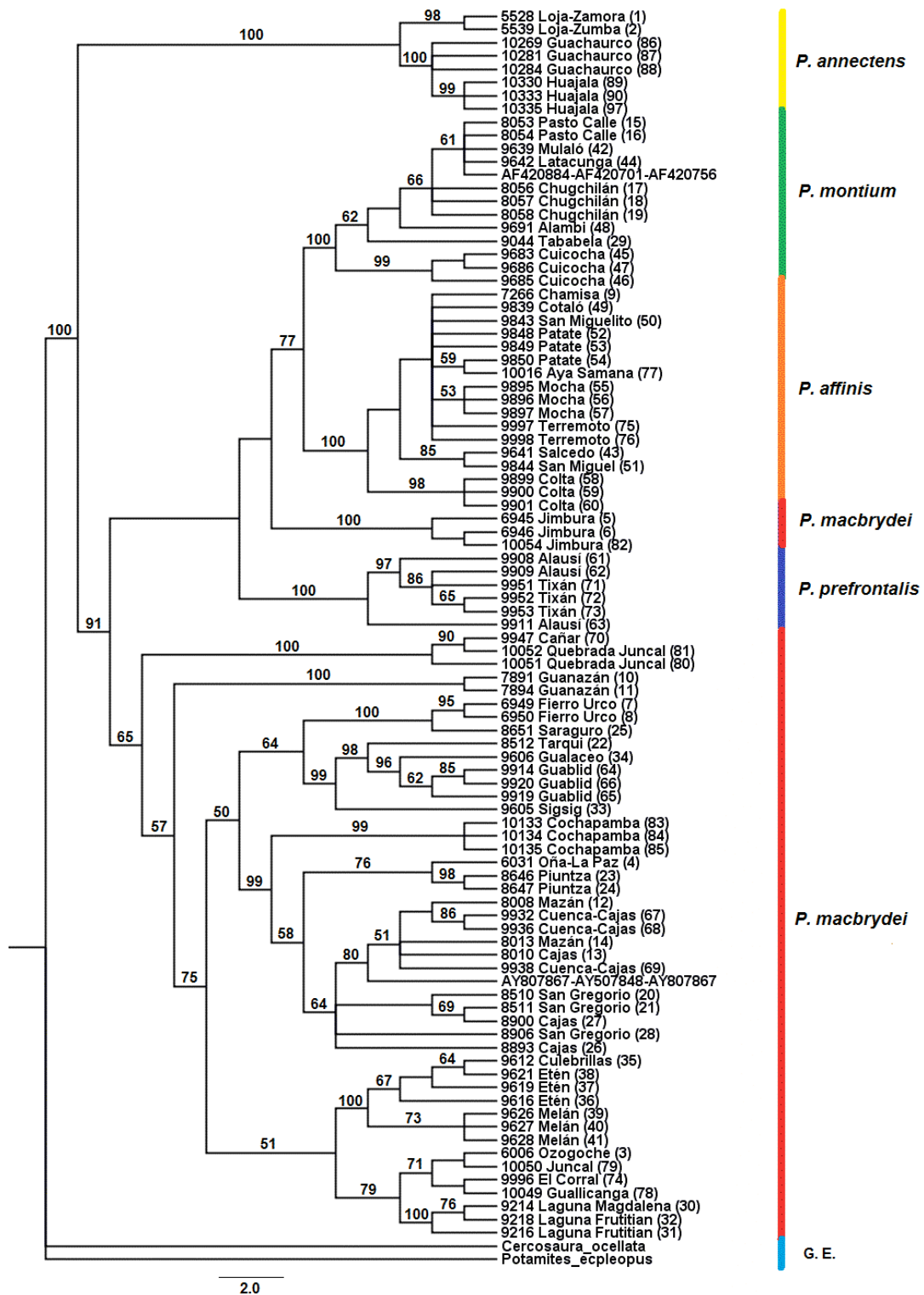


Figura 4. Árbol consenso con regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y ND4. Se muestran los valores de bootstrap y el número QCAZ-R único para cada individuo. Los números en paréntesis hacen referencia a su respectiva localidad (Figura 2 y Anexo 1).

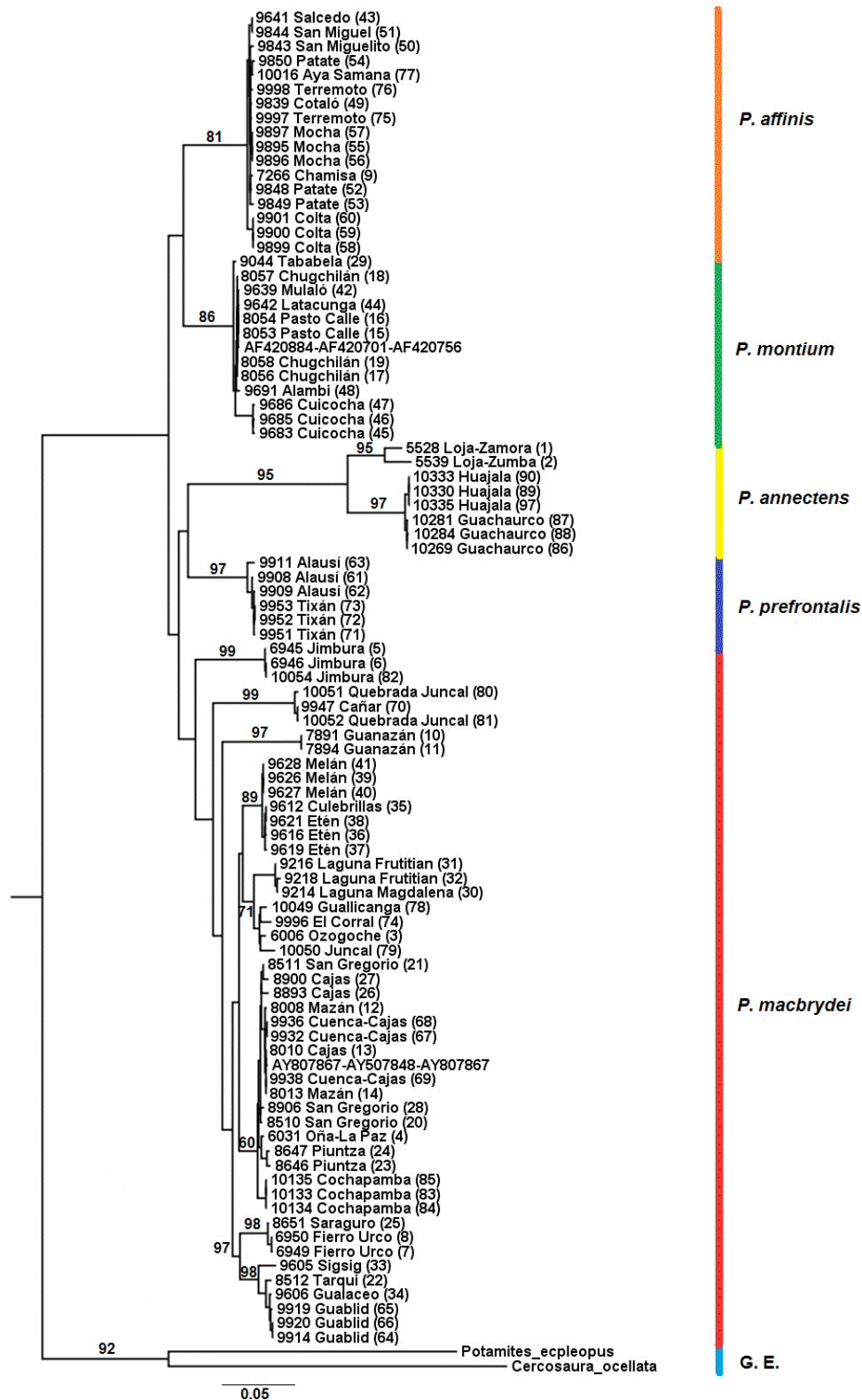


Figura 5. Filograma del análisis de máxima verosimilitud de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y ND4. Se muestran los valores de bootstrap y el número QCAZ-R único para cada individuo. Los números en paréntesis hacen referencia a su respectiva localidad (Figura 2 y Anexo 1).

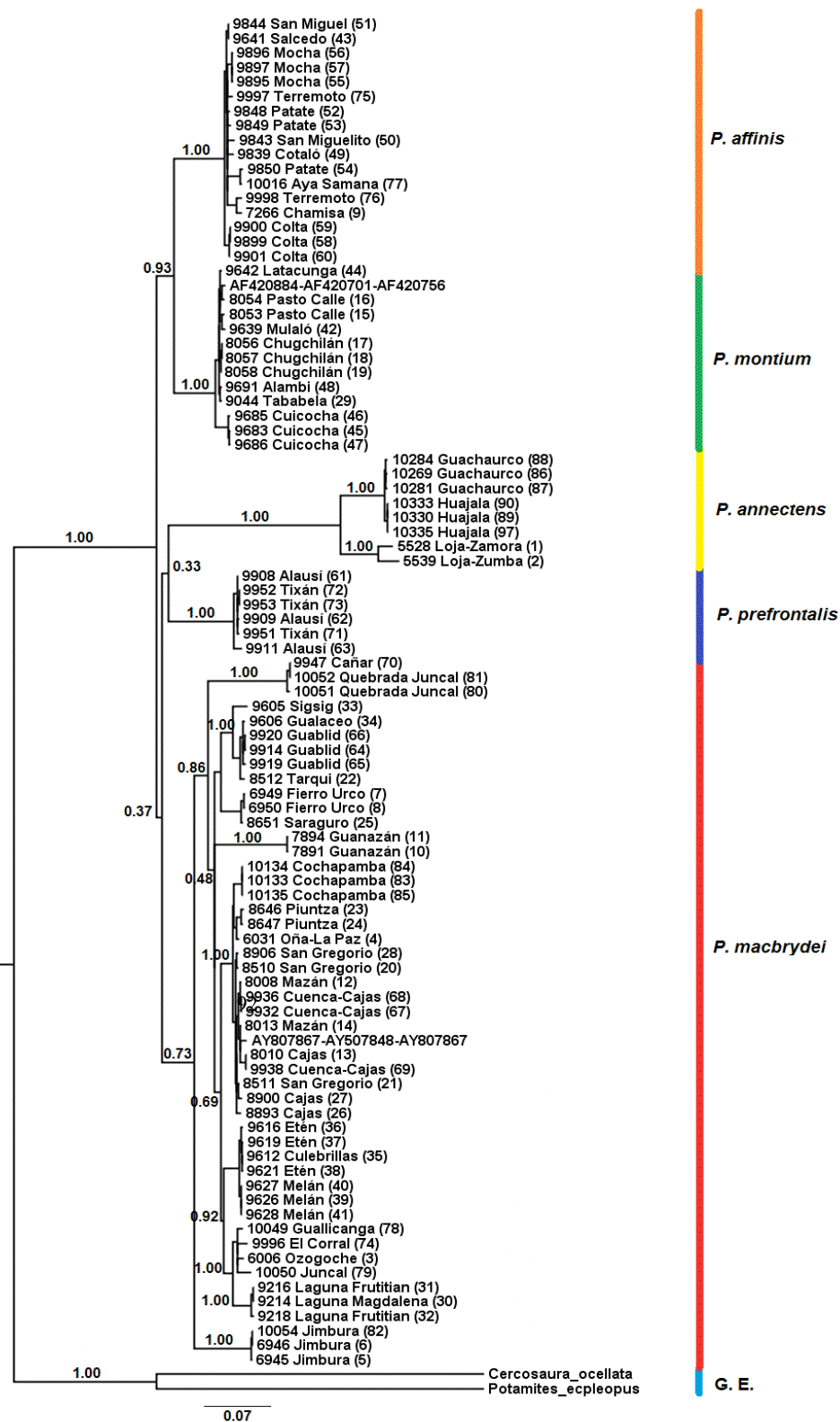


Figura 6. Filograma del análisis bayesiano de las secuencias combinadas de los genes 12S, 16S y ND4. Se muestran los valores de probabilidades posteriores y el número QCAZ-R único para cada individuo. Los números en paréntesis hacen referencia a su respectiva localidad (Figura 2 y Anexo 1).

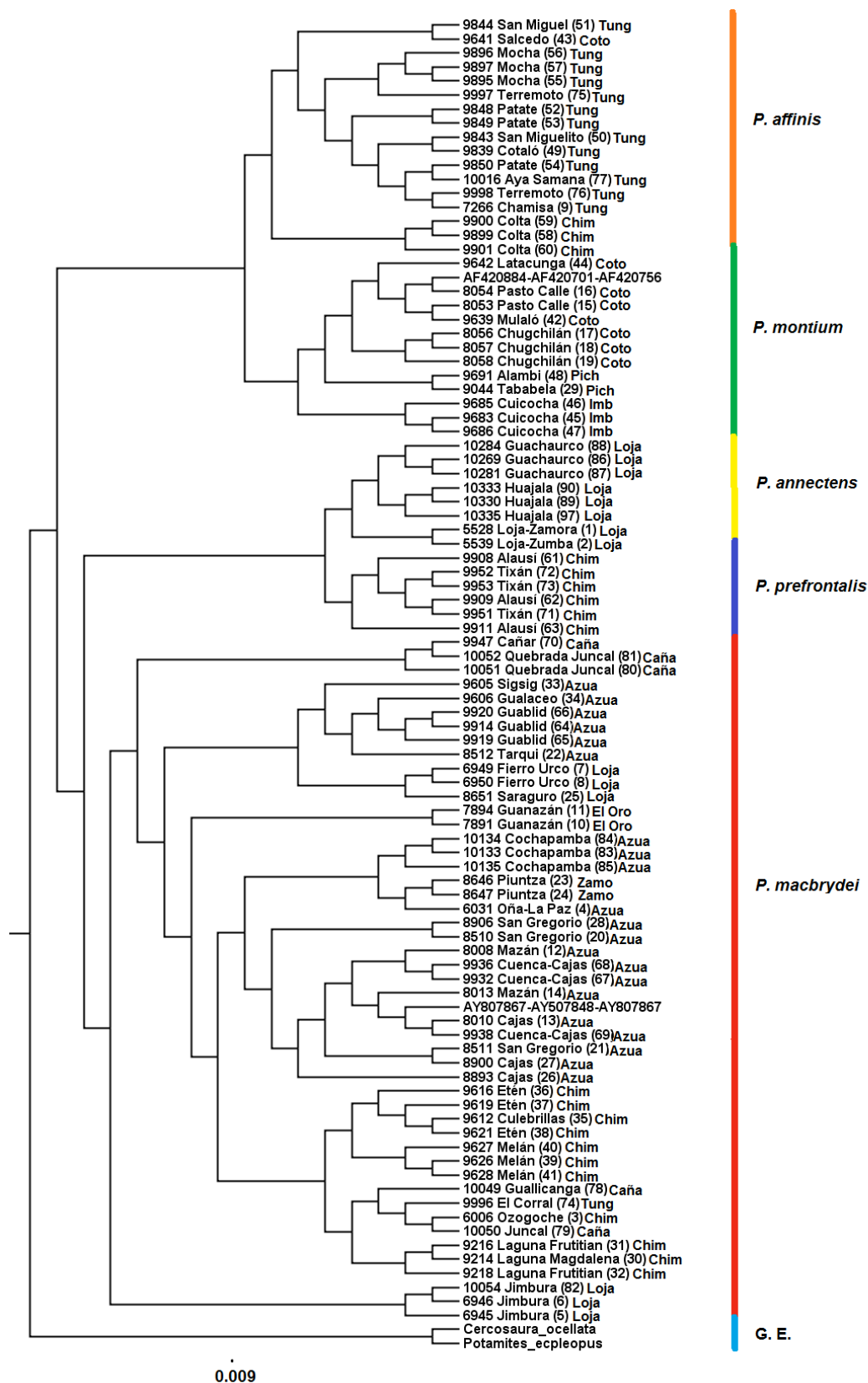


Figura 7. Árbol filogenético del análisis bayesiano que estima tiempo de divergencia entre clados.

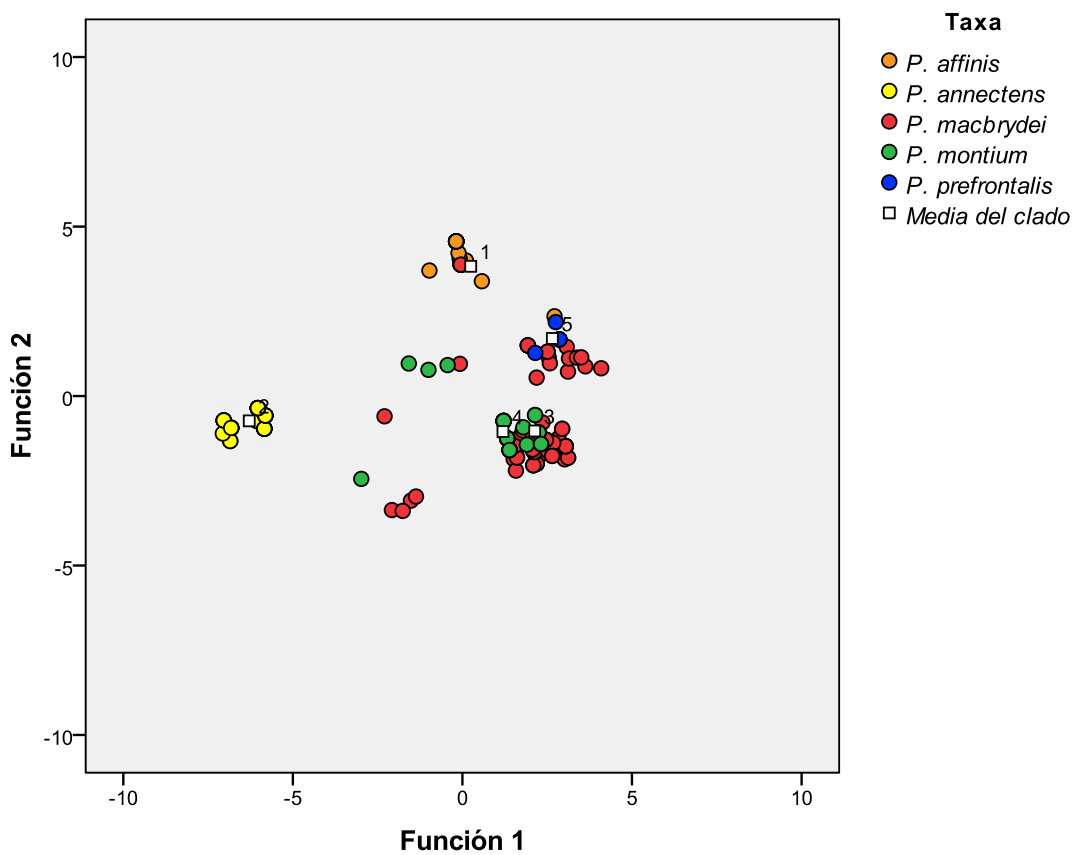


Figura 8. Proyección de las variables morfológicas cualitativas sobre las funciones F1 y F2 del análisis discriminante de machos y hembras adultos, pertenecientes a las cinco especies del género *Pholidobolus*.

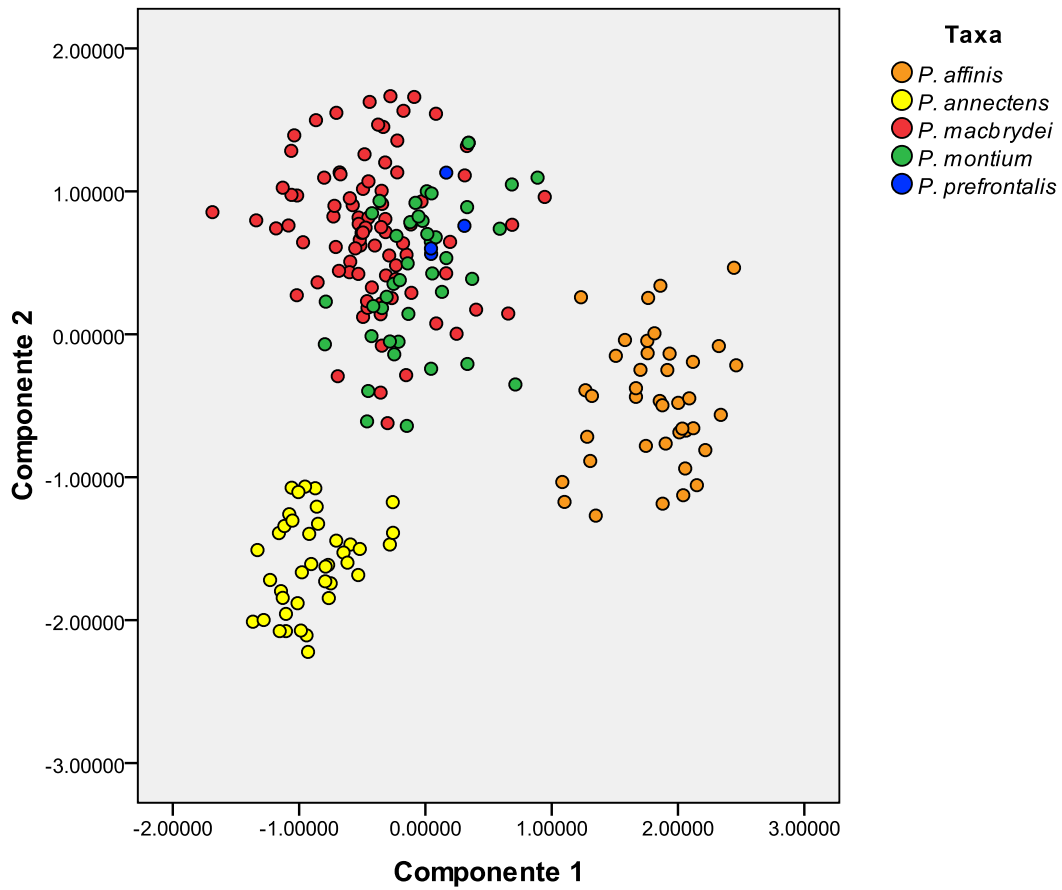


Figura 9. Proyección de las variables morfológicas cuantitativas sobre los componentes principales CP1 y CP2 del análisis de componentes principales de machos y hembras adultos, pertenecientes a las cinco especies del género *Pholidobolus*.

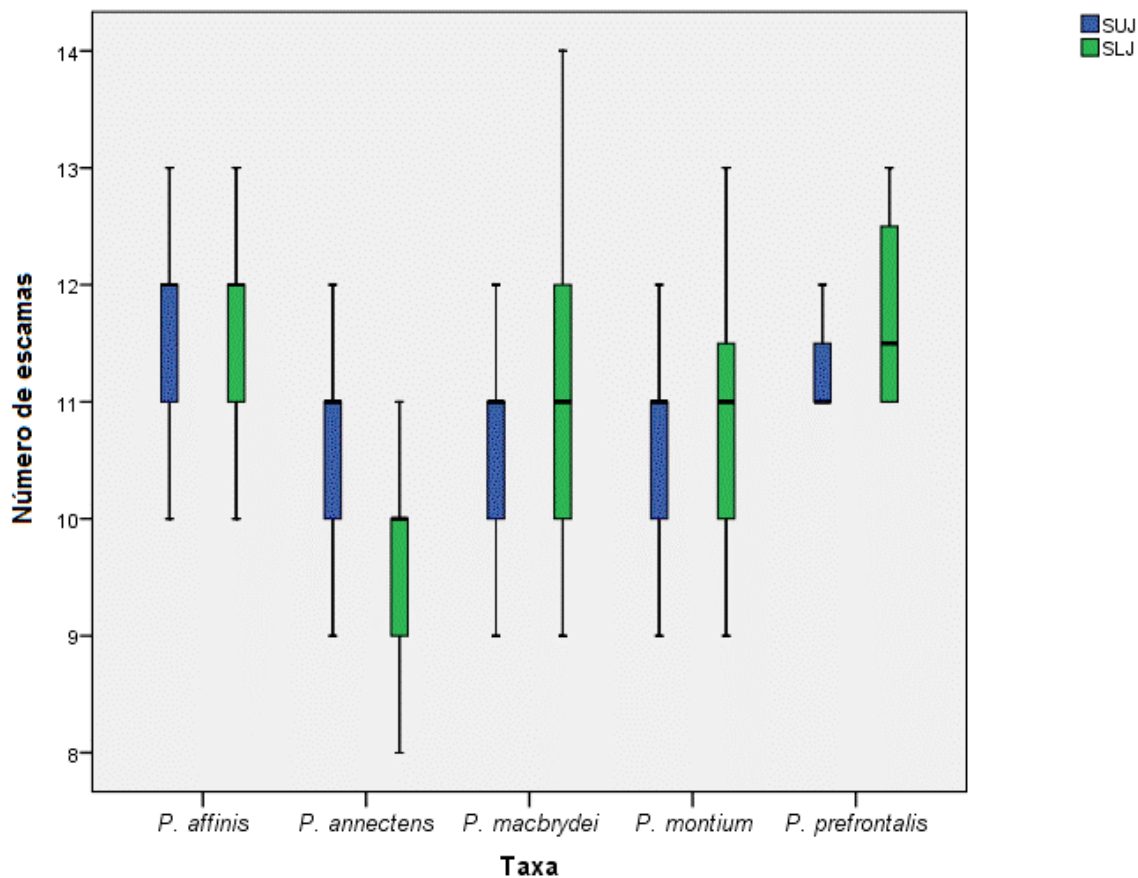


Figura 10. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas a lo largo del margen de la mandíbula superior (SUJ) y número de escamas a lo largo de la mandíbula inferior (SLJ) en cinco especies del género *Pholidobolus*. Se indica el rango intercuartil (longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).

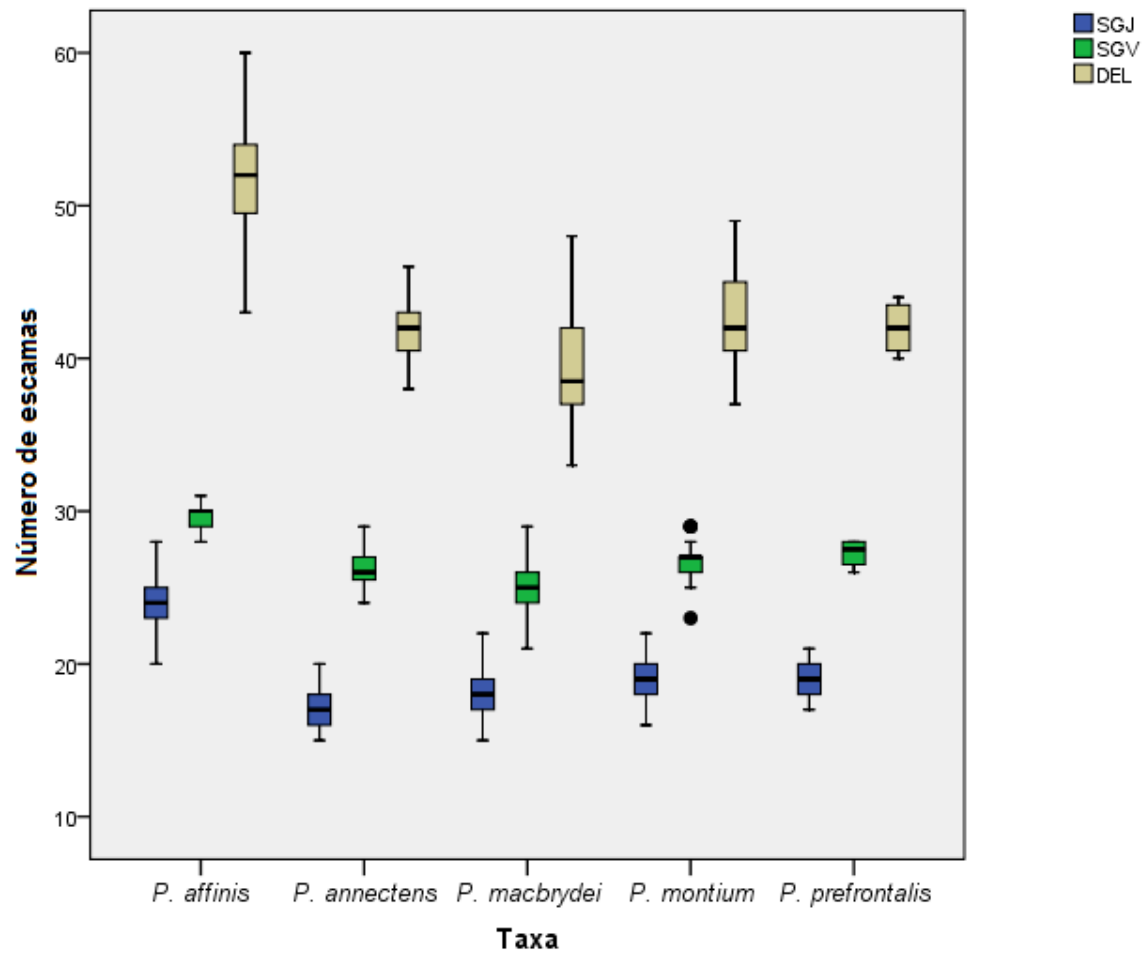


Figura 11. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas gulares y mandibulares (SGJ), número de escamas ventrales (SGV) y número de escamas dorsales (DEL) en cinco especies del género *Pholidobolus*. Se indica el rango intercuartil (longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).

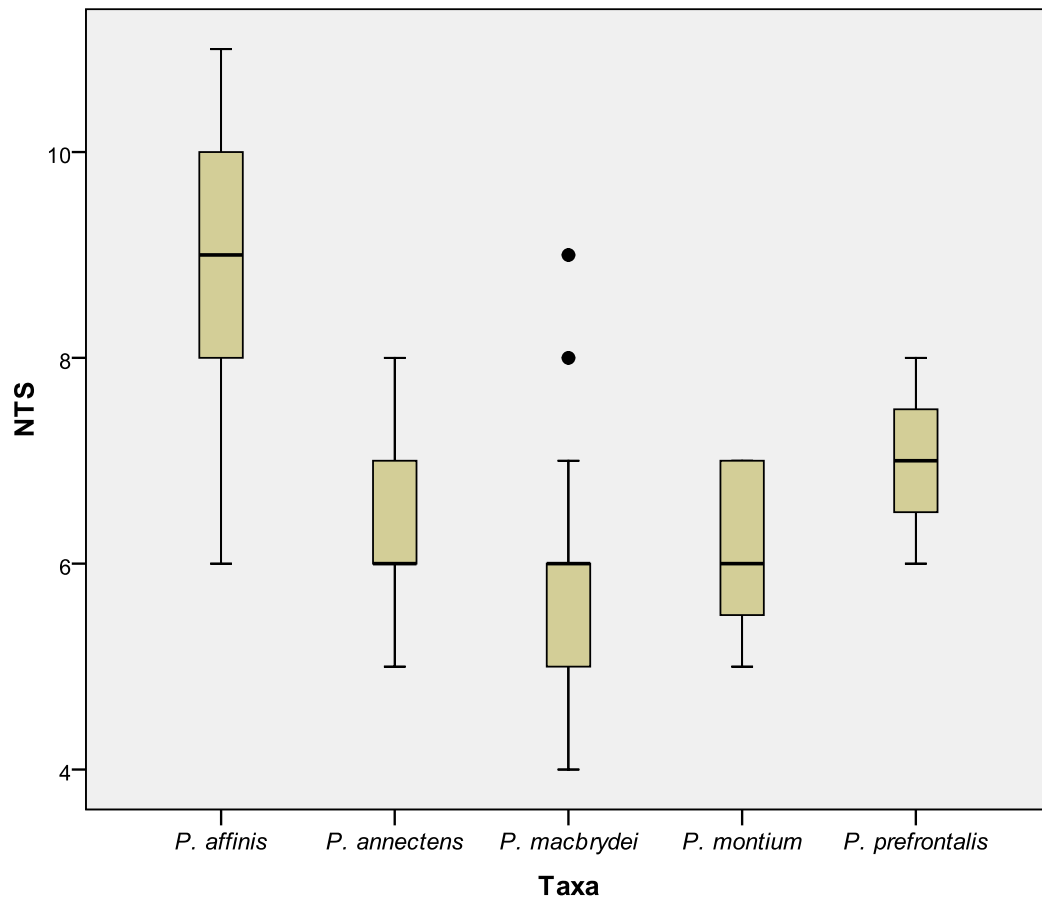


Figura 12. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas temporales (NTS) en cinco especies del género *Pholidobolus*. Se indica el rango intercuartil (longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).

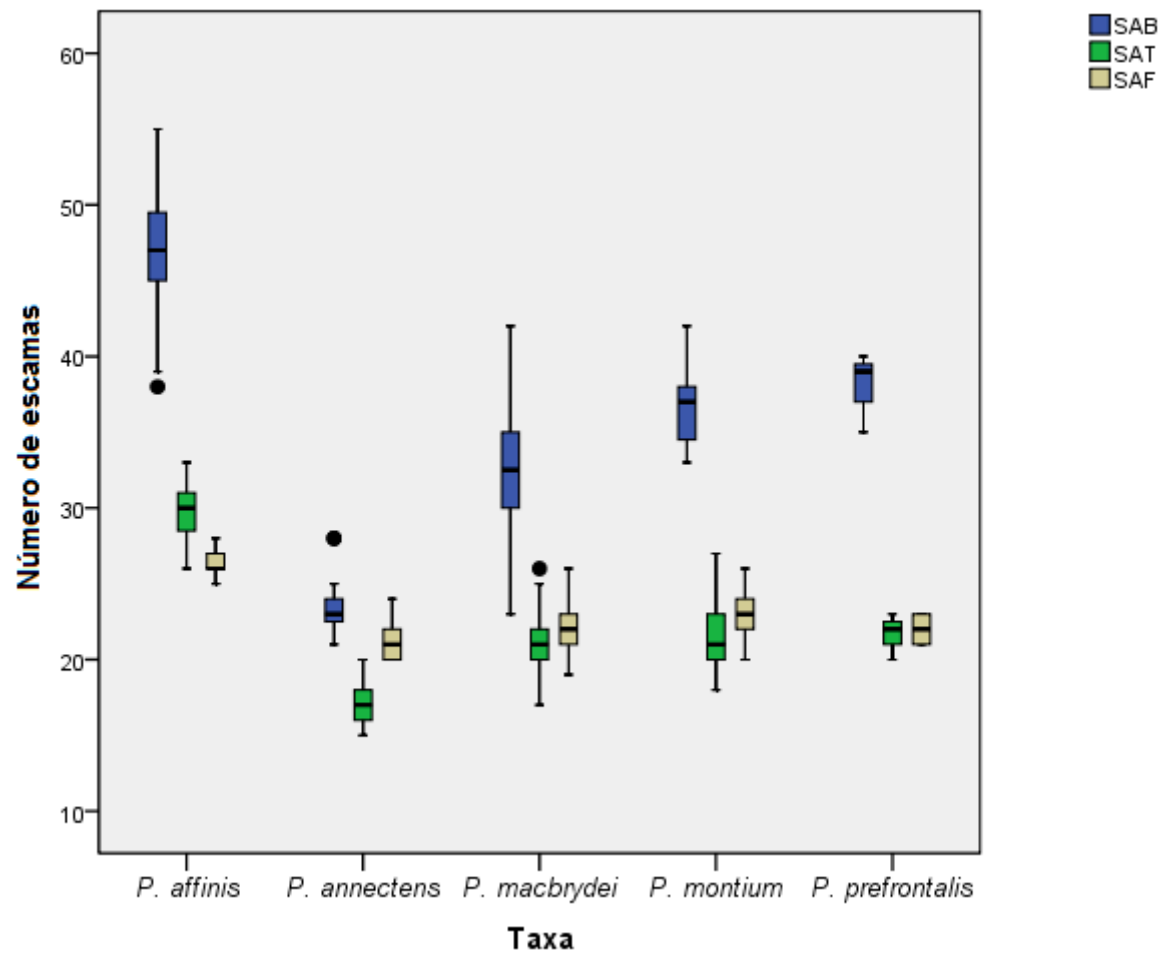


Figura 13. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas alrededor del cuerpo (SAB), número de escamas alrededor de la cola (SAT) y número de escamas alo largo de la extremidad anterior (SAF) en cinco especies del género *Pholidobolus*. Se indica el rango intercuartil (longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).

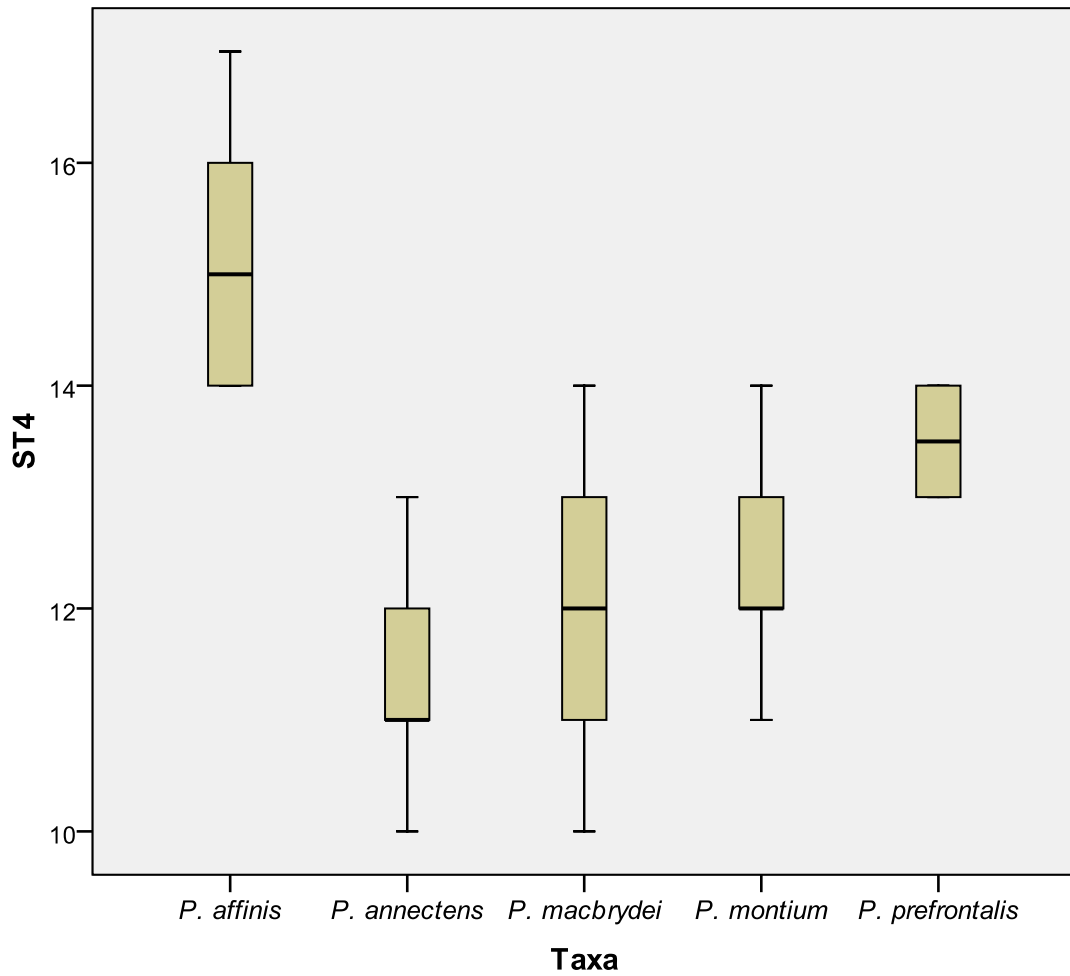


Figura 14. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en el número de escamas del cuarto dedo de la pata posterior (ST4) en cinco especies del género *Pholidobolus*. Se indica el rango intercuartil (longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).

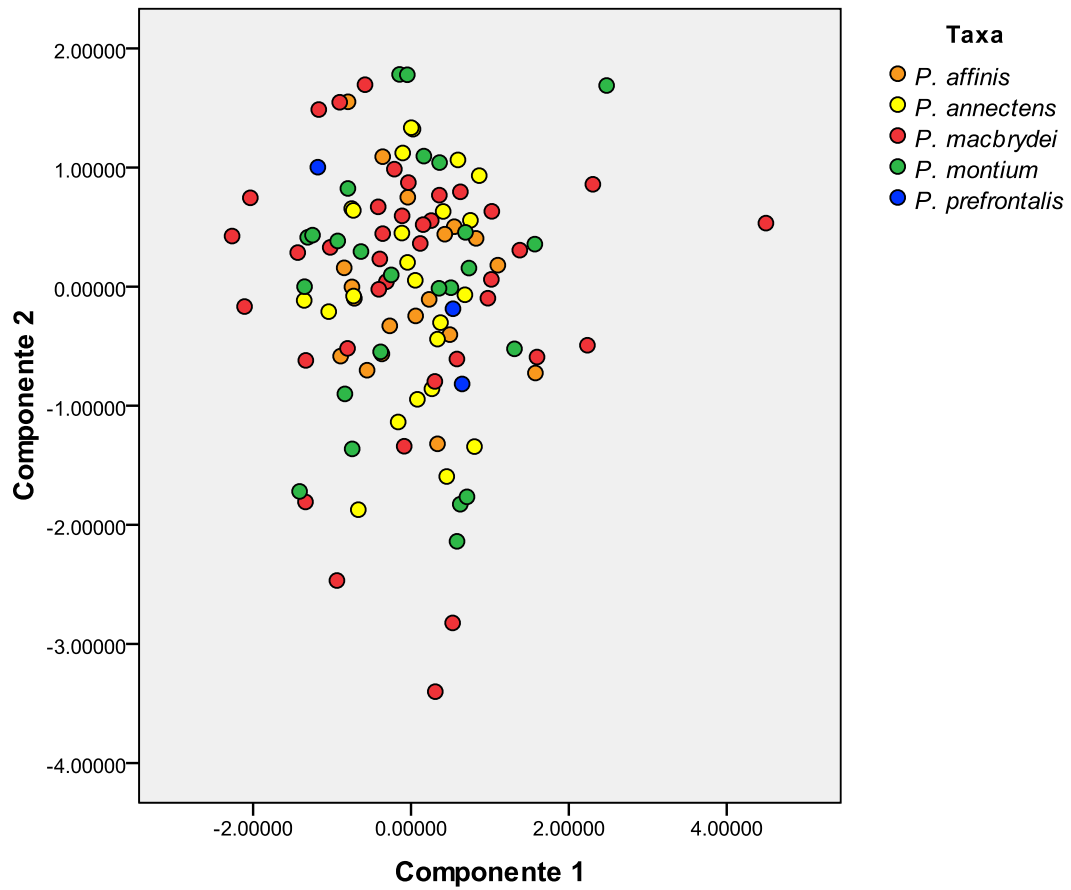


Figura 15. Proyección de las variables morfométricas de hembras adultos sobre los componentes principales CP1 y CP2 del análisis de componentes principales, pertenecientes a las cinco especies del género *Pholidobolus*.

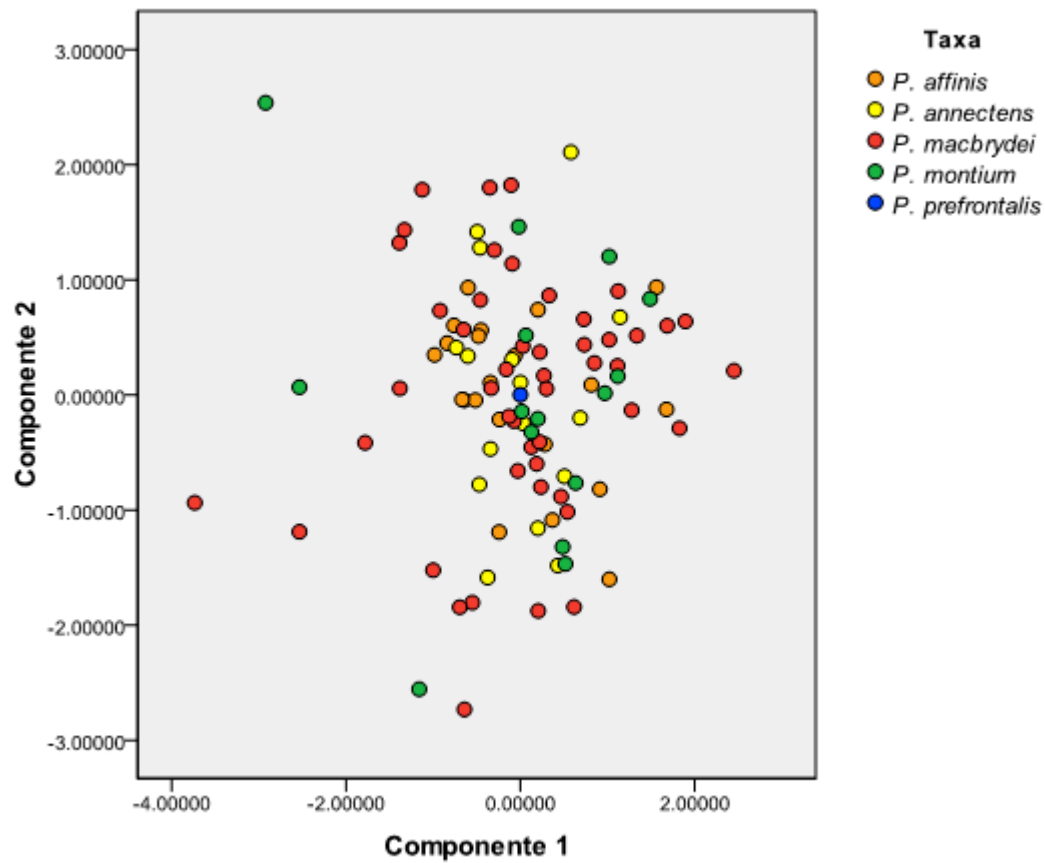


Figura 16. Proyección de las variables morfométricas de machos adultos sobre los componentes principales CP1 y CP2 del análisis de componentes principales, pertenecientes a las cinco especies del género *Pholidobolus*.

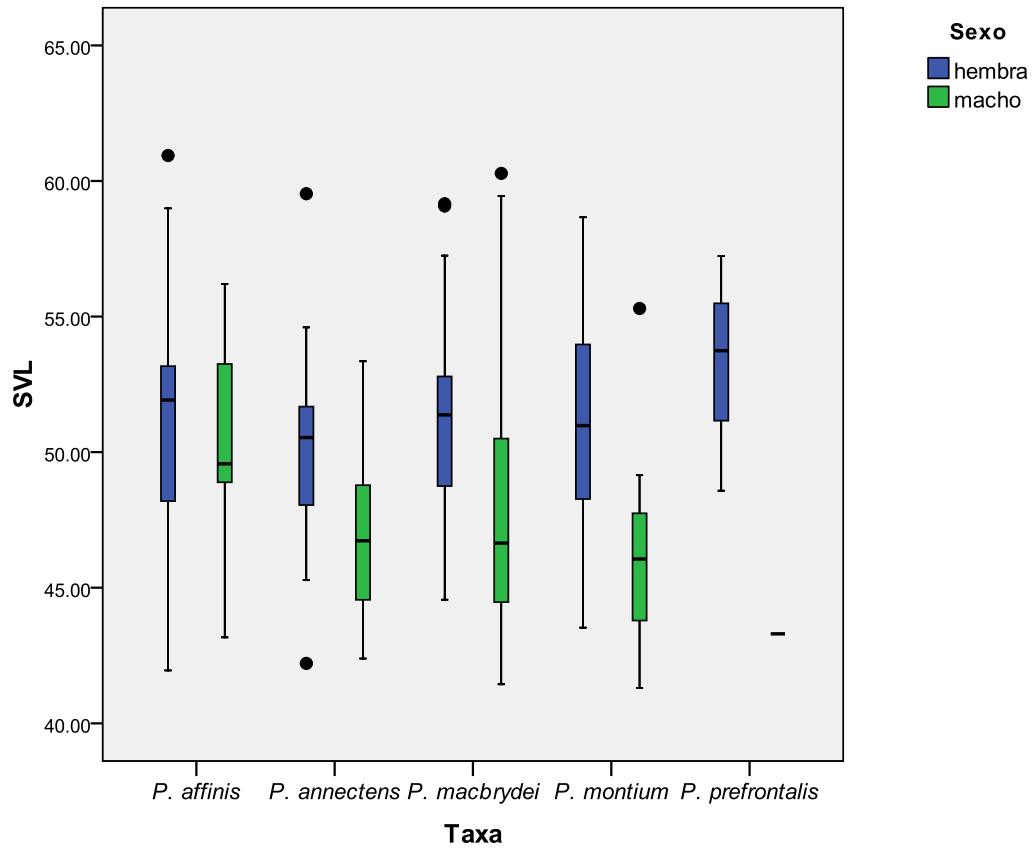


Figura 17. Diagrama de caja que ilustra la variación intra e interespecífica en la variable morfológica longitud rostro-cloaca (SVL) en cinco especies del género *Pholidobolus*. Se indica el rango intercuartil (longitud de la caja) y los límites sobre los cuales se ubican los datos atípicos (barras de error).

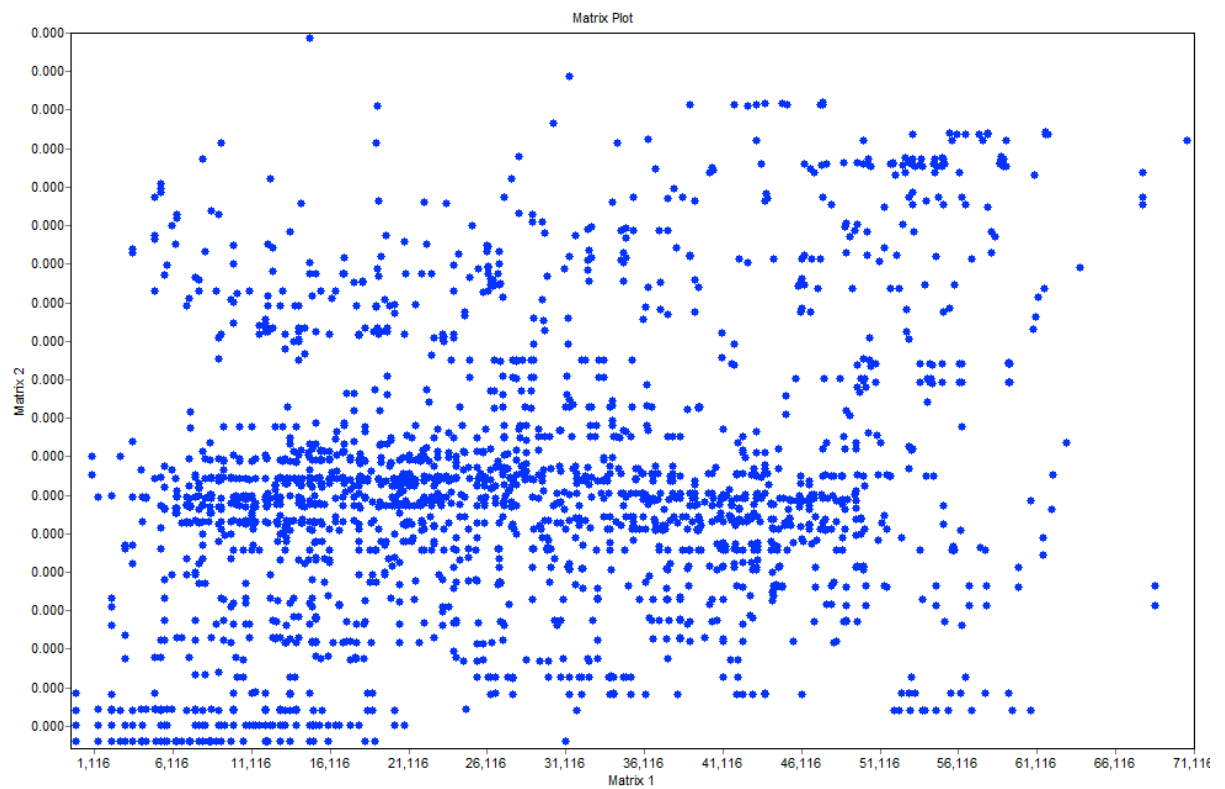


Figura 19. Matriz de correlación de distancias geográficas y distancias genéticas del gen mitocondrial 16S de los cinco clados de *Pholidobolus*. M1 representa las distancias geográficas y M2 las distancias genéticas.

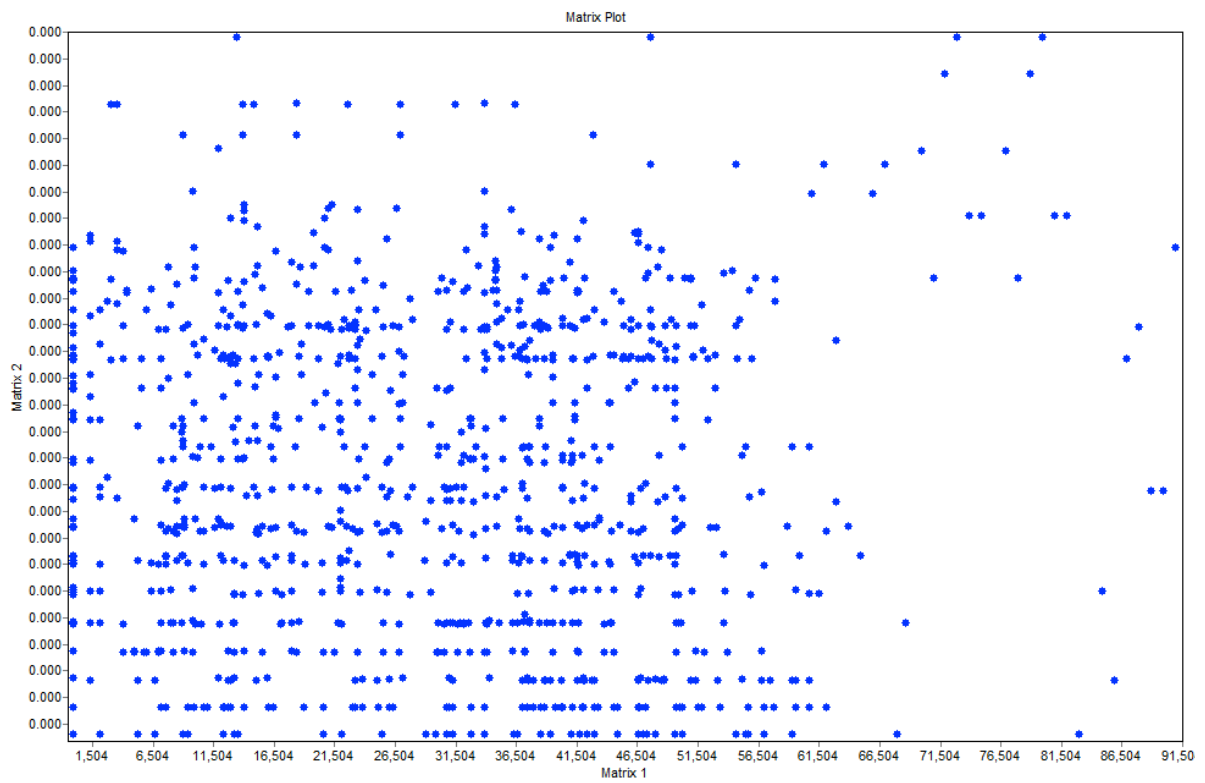


Figura 20. Matriz de correlación de distancias geográficas y distancias genéticas de los genes mitocondriales ND4, 12S y 16S de *P. macbrydei*. M1 representa las distancias geográficas y M2 las distancias genéticas.

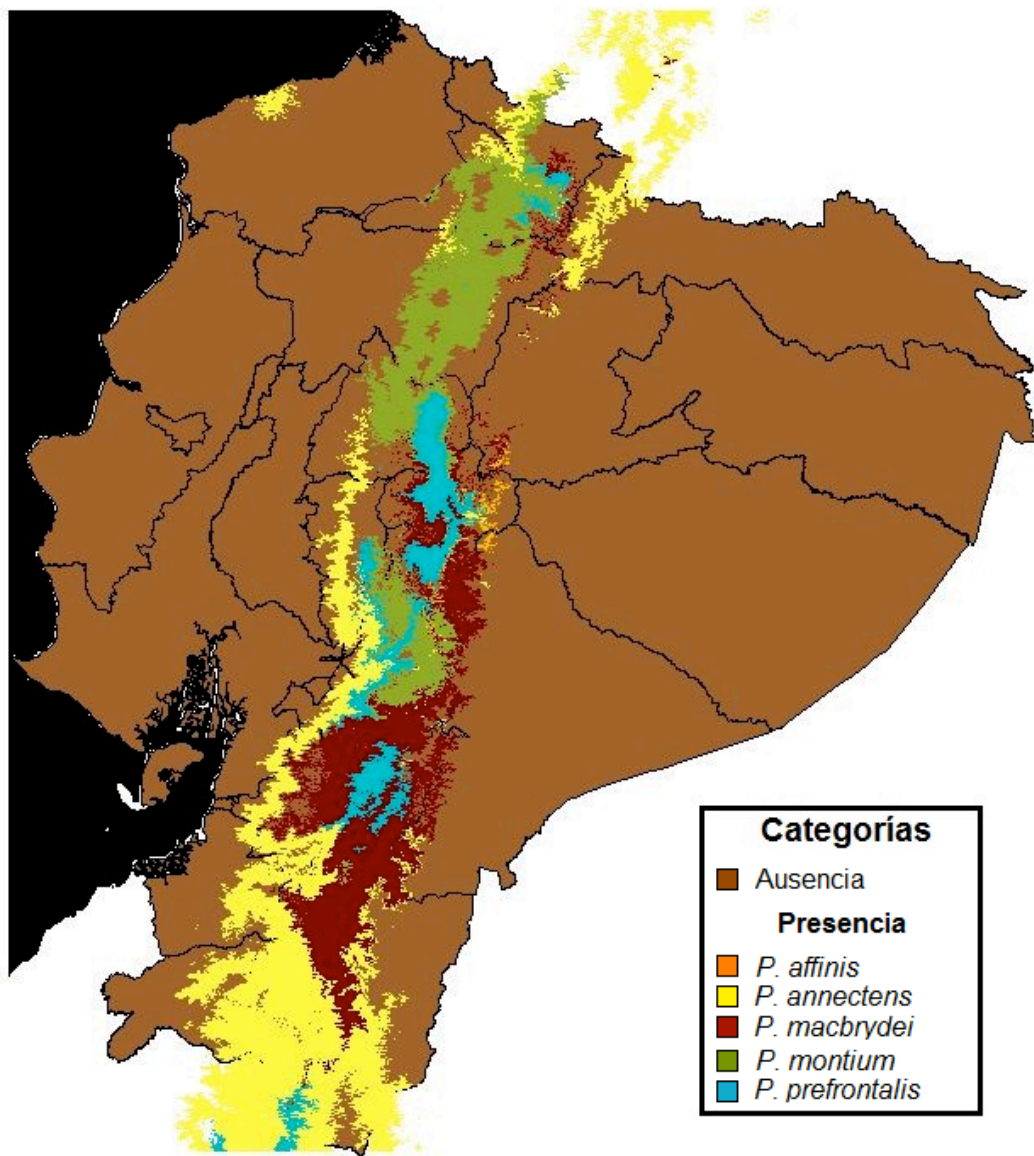


Figura 21. Modelo predictivo de nicho ecológico de las cinco especies del género *Pholidobolus*.

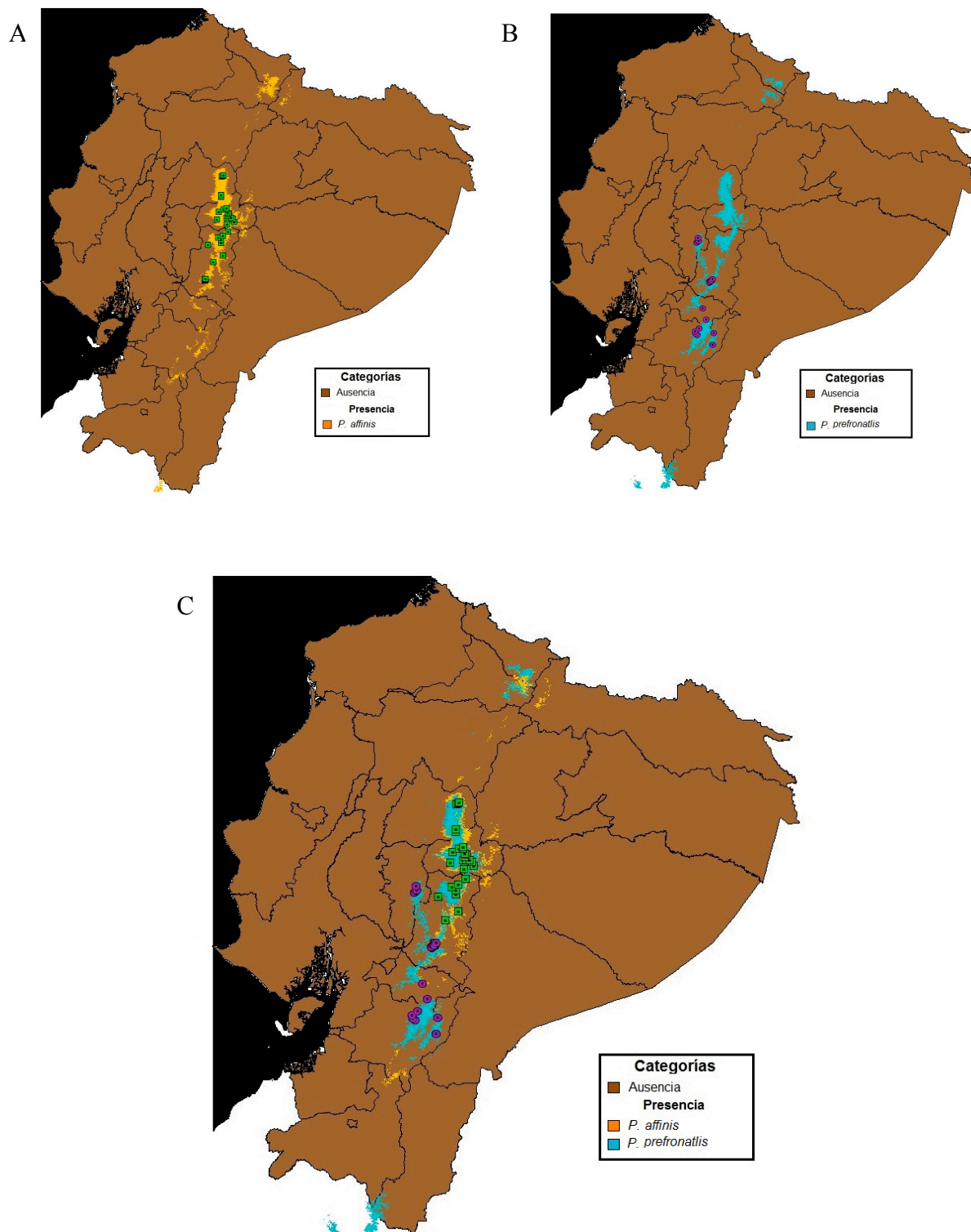


Figura 22. Modelo predictivo de nicho ecológico de *P. affinis* (A), *P. prefrontalis* (B) y de *P. affinis* y *P. prefrontalis* (C). Los cuadrados verdes representan las localidades de *P. affinis* y los círculos morados las localidades de *P. prefrontalis*.

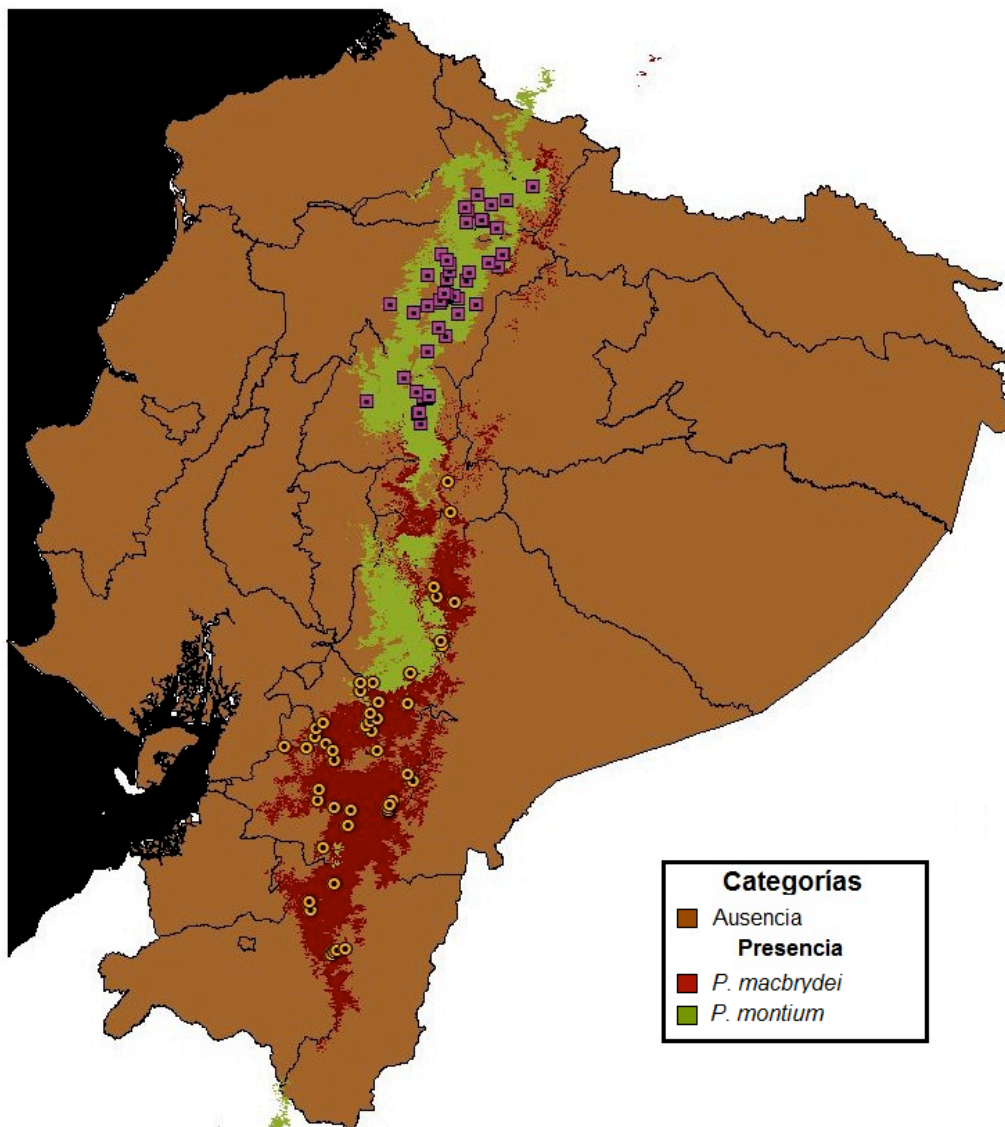


Figura 23. Modelo predictivo de nicho ecológico de las especies *P. macbrydei* y *P. montium*. Los cuadrados morados representan las localidades de *P. montium* y los círculos rojos las localidades de *P. macbrydei*.

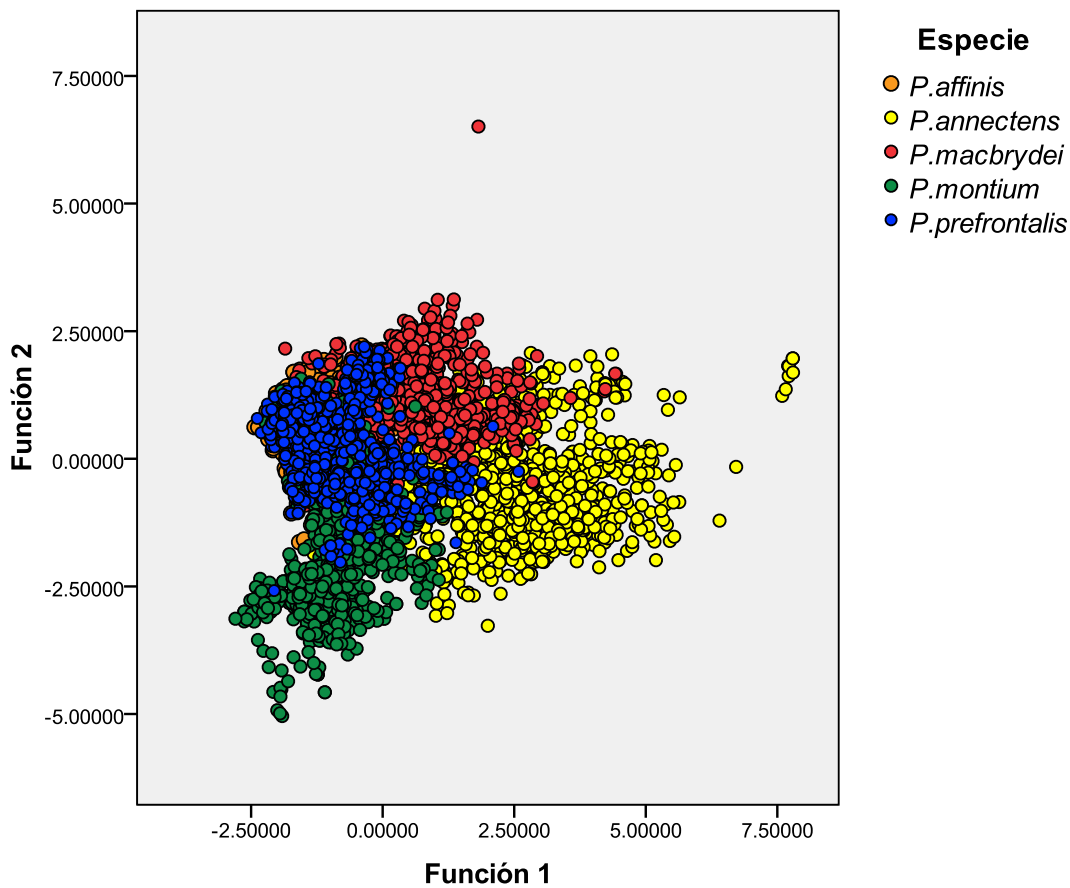


Figura 24. Proyección de los puntos aleatorios extraídos de los modelos de nicho asociados a las 19 variables bioclimáticas sobre las funciones F1 y F2 del análisis discriminante, de las cinco especies del género *Pholidobolus*.

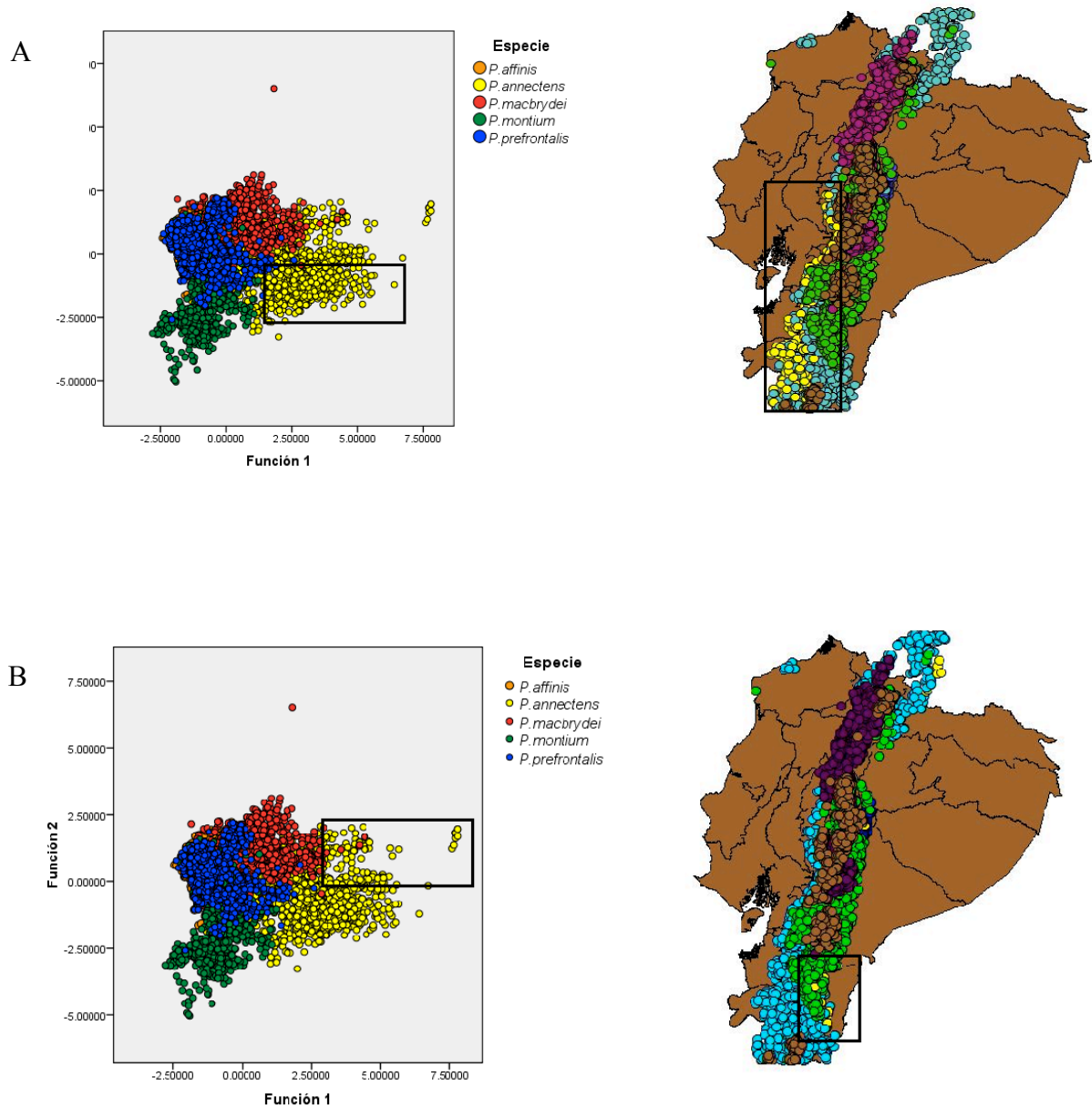


Figura 25. Proyección geográfica de los puntos aleatorios extraídos de los modelos de nicho asociados a las 19 variables bioclimáticas, pertenecientes a la especie *P. annectens*. (A) Poblaciones del occidente del Ecuador y (B) Poblaciones del oriente del Ecuador.

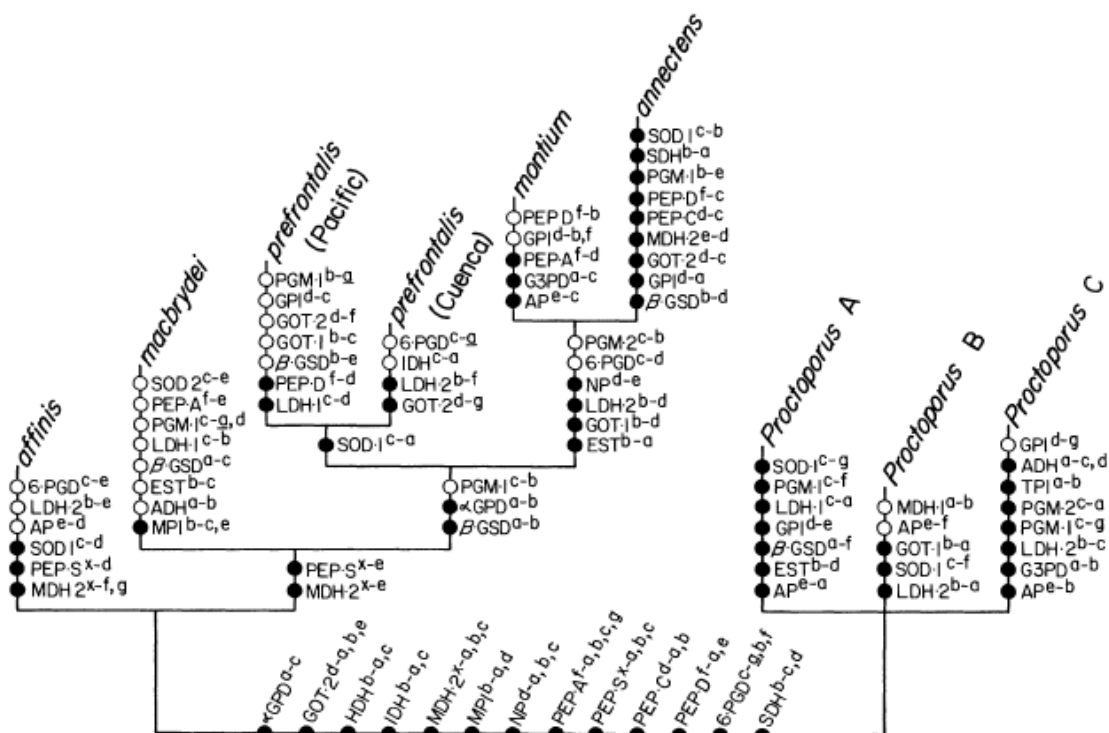


Figura 26. Cladograma de *Pholidobolus* basado en aloenzimas (Hillis, 1985). Cambios en los estados alélicos son indicados a lo largo de cada rama. Retención de un alelo primitivo es indicado por un círculo blanco. Pérdida completa de un alelo primitivo es indicado por un círculo negro (véase Hillis, 1985).

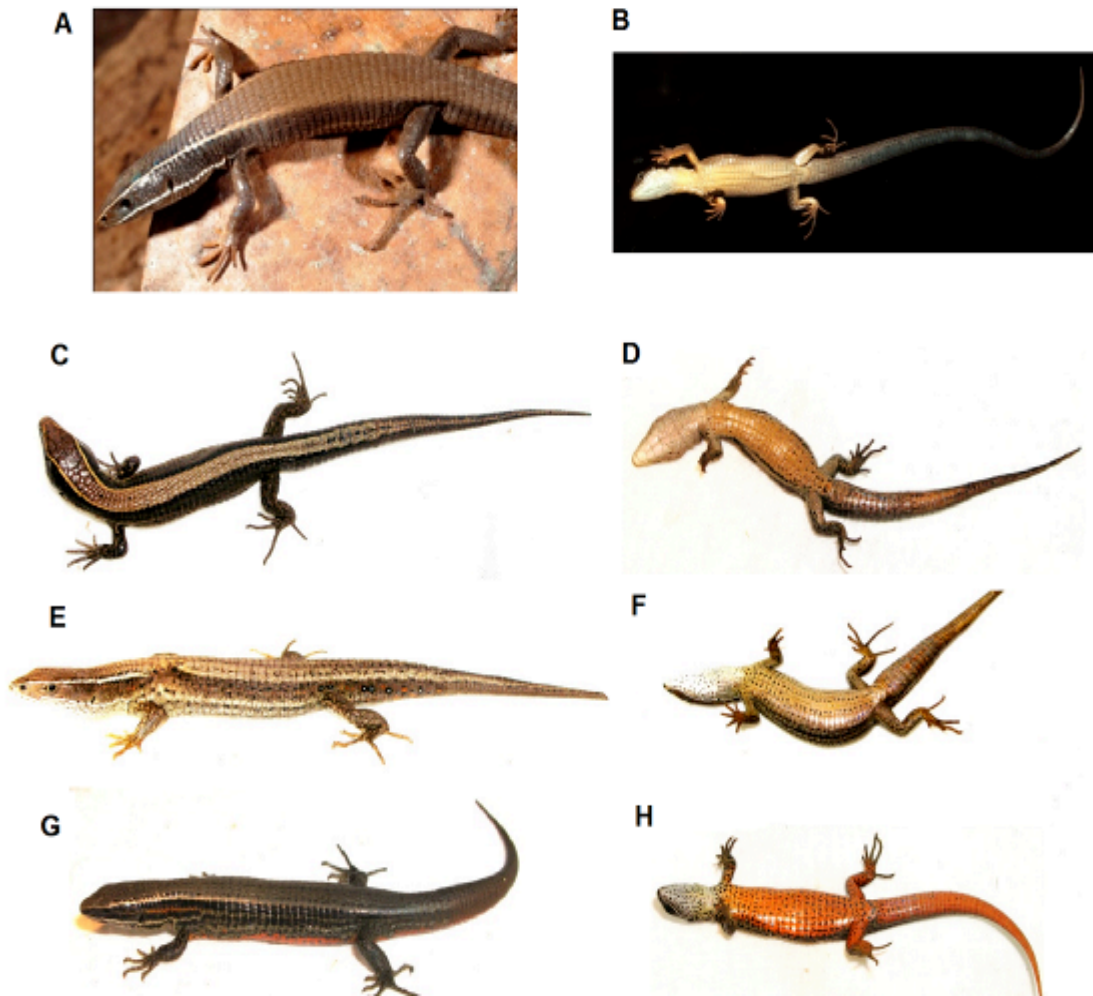


Figura 27. Fotografías de individuos machos adultos de *P. macbrydei*. Vista dorsal (A, C, E, G), vista ventral (B, D, F, H). El Oro: Localidad Guanazán (A, B, QCAZ-R 7894). Loja: Localidad Jimbura (C, D, QCAZ-R 10054). Cañar: Localidad Juncal (E, F, QCAZ-R 10053). Cañar: Localidad Juncal-Panamericana (G, H, QCAZ-R 10050). Fotografías: Silvia Aldás (C, D, E, F, G, H) y Luis Coloma (A, B).

10. TABLAS

Tabla 1. Lista de genes con sus respectivos cebadores y secuencias (5' – 3') de ADN citados por Pellegrino *et al.*, 2001.

Gen	Cebador	Secuencia
12S	12Sa	CTGGGATTAGATACCCCACTA
12S	12Sb	TGAGGAGGGTGACGGGCGGT
16S	16SL	CGCCTGTTTAACAAAAACAT
16S	16SH	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
16S	16SF.0	CTGTTTACCAAAAACATMRCCTYTAGC
16S	16SR.0	TAGATAGAAACCGACCTGGATT
ND4	ND4F	CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAG AAGC
ND4	ND4R	CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA

Tabla 2. Protocolos para la amplificación de los genes mitocondriales, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Gen	Cebador	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elongación final
12S	12Sa y 12Sb	96. °C (3 min) 1 ciclo	95 °C (30 seg) 40-45 ciclos	52°C (1 min) 40-45 ciclos	72°C (1 min) 40-45 ciclos	72°C (10 min) 1 ciclo
16S	16SL y 16SH	96°C (3 min) 1 ciclo	95 °C (30 seg) 40-45 ciclos	52°C (1 min) 40-45 ciclos	72°C (1 min) 40-45 ciclos	72°C (10 min) 1 ciclo
16S	16SF.0 y 16SR.0	96°C (3 min) 1 ciclo	95 °C (30 seg) 40-45 ciclos	52°C (1 min) 40-45 ciclos	72°C (1 min) 40-45 ciclos	72°C (10 min) 1 ciclo
ND4	ND4F y ND4R	96°C (3 min) 1 ciclo	95°C (25 seg) 35 ciclos	52°C (1 min) 35 ciclos	72°C (2 min) 35 ciclos	72°C (10 min) 1 ciclo

Tabla 3. Variables bioclimáticas obtenidas de Worldclim.

Simbología	Descripción
BIO1	Temperatura media anual
BIO2	Rango de temperatura mensual
BIO3	Isotermalidad
BIO4	Estacionalidad de temperatura
BIO5	Temperatura máxima del mes más caliente
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío
BIO7	Rango de temperatura anual
BIO8	Temperatura media del cuatrimestre más húmedo
BIO9	Temperatura media del cuatrimestre más seco
BIO10	Temperatura media del cuatrimestre más cálido
BIO11	Temperatura media del cuatrimestre más frío
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15	Estacionalidad de precipitación
BIO16	Precipitación del cuatrimestre más húmedo
BIO17	Precipitación del cuatrimestre más seco
BIO18	Precipitación del cuatrimestre más cálido
BIO19	Precipitación del cuatrimestre más frío

Tabla 4. Parámetros escogidos para la evaluación de la capacidad predictiva de los cinco modelos del género *Pholidobolus*.

Especie	Grupo de datos	Prueba aleatoria	Número de repeticiones
<i>P. affinis</i>	32	33 %	4
<i>P. annectens</i>	14	10 %	10
<i>P. macbrydei</i>	50	25 %	5
<i>P. montium</i>	49	25 %	5
<i>P. prefrontalis</i>	19	15 %	10

Tabla 5. Modelos de evolución obtenidos del JModelTest en base al criterio de información Akaike (AIC).

Gen	Modelo	Freq A	Freq C	Freq G	Freq T	p-inv	Gamma
12S	Tim3+I+G	0,2366	0,1674	0,2303	0,3658	0,4410	0,3820
16S	Tim2+I+G	0,3332	0,2411	0,1860	0,2398	0,59	0,464
ND4	GTR+I+G	0,3467	0,2804	0,0944	0,2786	0,439	0,882

Tabla 6. Comparación de las distancias genéticas del gen mitocondrial 16s entre los 5 clados. Se presenta la media y la desviación estándar, seguidas del rango en paréntesis.

	<i>affinis</i>	<i>annectens</i>	<i>macbrydei</i>	<i>montium</i>	<i>prefrontalis</i>
<i>affinis</i>	0,0017 ± 0,017 (0,000-0,006)				
<i>annectens</i>	0,077 ± 0,0039 (0,070-0,086)	0,165 ± 0,165 (0,000-0,039)			
<i>macbrydei</i>	0,035 ± 0,006 (0,020-0,052)	0,061 ± 0,006 (0,045-0,091)	0,019 ± 0,011 (0,000-0,052)		
<i>montium</i>	0,033 ± 0,003 (0,024-0,0401)	0,070 ± 0,006 (0,059-0,078)	0,028 ± 0,005 (0,017-0,028)	0,002 ± 0,002 (0,000-0,0083)	
<i>prefrontalis</i>	0,031 ± 0,002 (0,027-0,035)	0,064 ± 0,005 (0,052-0,070)	0,034 ± 0,0037 (0,025-0,047)	0,036 ± 0,001 (0,034-0,040)	0,002 ± 0,002 (0,000-0,006)

Tabla 7. Resultados del análisis discriminante que indica el porcentaje de variancia aportado por cada función para las variables morfológicas cualitativas de machos y hembras adultos

Función	Eigenvalue	% Variancia	% Acumulativo	Correlación canónica
1	10,042	68,6	68,6	0,954
2	3,679	25,1	93,7	0,887
3	0,822	5,6	99,3	0,672
4	0,103	0,7	100,0	0,306

Tabla 8. Resultados del análisis discriminante que indica el porcentaje de correlación de cada variable cualitativa categórica de machos y hembras adultos de los cinco clados con cada función discriminante.

Variables	Función			
	1	2	3	4
Escamas granulares laterales	0,699	0,282	-0,353	0,433
Escamas del párpado inferior	0,214	0,068	-0,084	0,151
Escamas prefrontales	0,107	0,732	0,272	-0,530
Tipo de escamas dorsales	0,050	-0,504	0,014	0,424
Forma de escamas dorsales	-0,105	0,286	-0,228	-0,021
Extensión anterior de la franja dorsolateral	0,138	-0,173	0,462	0,357
Arreglo de escamas dorsales	0,175	0,259	0,403	0,107
Poros femorales	-0,035	-0,116	0,303	0,089
Franjas en los flancos del cuerpo	0,522	-0,579	-0,092	-0,593

Tabla 9. Resultados del análisis discriminante que indica el número y el porcentaje de individuos predichos por grupo para las variables morfológicas cualitativas de machos y hembras adultos de las cinco especies del género *Pholidobolus*.

			Predicción de la pertenencia de grupos					
		Especie	<i>affinis</i>	<i>annectens</i>	<i>macbrydei</i>	<i>montium</i>	<i>prefrontalis</i>	Total
Original	Conteo	<i>affinis</i>	34	0	0	0	6	40
		<i>annectens</i>	0	40	0	0	0	40
		<i>macbrydei</i>	1	1	58	13	13	86
		<i>montium</i>	1	1	5	33	0	40
		<i>prefrontalis</i>	0	0	0	0	4	4
	%	<i>affinis</i>	85,0	0,0	0,0	0,0	15,0	100,0
		<i>annectens</i>	,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
		<i>macbrydei</i>	1,2	1,2	67,4	15,1	15,1	100,0
		<i>montium</i>	2,5	2,5	12,5	82,5	,0	100,0
		<i>prefrontalis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
Validación cruzada	Conteo	<i>affinis</i>	34	0	0	0	6	40
		<i>annectens</i>	0	40	0	0	0	40
		<i>macbrydei</i>	2	3	51	16	14	86
		<i>montium</i>	3	1	5	31	0	40
		<i>prefrontalis</i>	0	0	0	0	4	4
	%	<i>affinis</i>	85,0	0,0	0,0	0,0	15,0	100,0
		<i>annectens</i>	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
		<i>macbrydei</i>	2,3	3,5	59,3	18,6	16,3	100,0
		<i>montium</i>	7,5	2,5	12,5	77,5	0,0	100,0
		<i>prefrontalis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0

Tabla 10. Resultados de la prueba de análisis de variancia no paramétrico que indica si existen o no diferencias significativas entre machos y hembras de los cuatro clados para las variables morfológicas cuantitativas.

	<i>affinis</i>	<i>annectens</i>	<i>macbrydei</i>	<i>montium</i>
<i>affinis</i>	p = 0,0681			
<i>annectens</i>		p = 0,3742		
<i>macbrydei</i>			p = 0,1806	
<i>montium</i>				p = 0,9684

Tabla 11. Resultados de la prueba de análisis de variancia no paramétrico que indica si existen o no diferencias significativas entre los cuatro clados para las variables morfológicas cuantitativas.

Permutaciones	10 000
Suma de cuadrados totales	0,8591
Suma de cuadrados dentro de grupos	0,2063
F	213
p	<0,0001

Tabla 12. Resultados del análisis discriminante que indica el porcentaje que aporta cada variable morfológica cuantitativa de machos y hembras adultos de los cuatro clados.

Variables	Función		
	1	2	3
Número de escamas supraoculares	0,934	-0,136	-0,254
Número de escamas de la mandíbula superior	-0,004	-0,295	-0,090
Número de escamas de la mandíbula inferior	0,088	0,184	-0,327
Número de escamas gulares y mandibulares	-0,043	-0,225	0,034
Número de escamas ventrales	0,045	-0,248	-0,074
Número de escamas dorsales	0,102	-0,337	0,283
Número de escamas temporales	-0,035	-0,320	0,114
Número de escamas alrededor del cuerpo	0,055	0,852	0,523
Número de escamas alrededor de la cola	0,308	0,017	-0,418
Número de escamas a lo largo de la pata anterior	-0,071	0,028	0,408
Número de escamas del tercer dedo de la pata anterior	0,104	-0,053	0,273
Número de escamas del quinto dedo de la pata anterior	-0,045	0,097	-0,320
Número de escamas del tercer dedo de la pata posterior	-0,053	0,063	0,045
Número de escamas del cuarto dedo de la pata posterior	0,101	-0,060	-0,049
Número de escamas del quinto dedo de la pata posterior	0,055	0,246	0,382
Número de escamas del párpado inferior	0,130	0,678	-0,199

Tabla 13. Resultados del análisis de Kruskal-Wallis que indica las diferencias estadísticamente significativas de cada variable morfológica cuantitativa entre cada clado.

		NSO				SUJ				SLJ			
		<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T
<i>ann</i>	p	0,00				0,00				0,00			
<i>mac</i>	p	0,00	0,50			0,00	0,42			0,00	0,00		
<i>mon</i>	p	0,00	1,00	0,49		0,00	0,74	0,27		0,00	0,00	0,50	
T	p				0,00				0,00				0,00
		SGJ				SGV				DEL			
		<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T
<i>ann</i>	p	0,00				0,00				0,00			
<i>mac</i>	p	0,00	0,00			0,00	0,00			0,00	0,00		
<i>mon</i>	p	0,00	0,00	0,00		0,00	0,37	0,00		0,00	0,37	0,00	
T	p				0,00				0,00				0,00
		NTS				SAB				SAT			
		<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T
<i>ann</i>	p	0,00				0,00				0,00			
<i>mac</i>	p	0,00	0,00			0,00	0,00			0,00	0,00		
<i>mon</i>	p	0,00	0,38	0,00		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,36	
T	p				0,00				0,00				0,00
		SAF				SF3				SF5			
		<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T
<i>ann</i>	p	0,00				0,00				0,00			
<i>mac</i>	p	0,00	0,00			0,00	0,17			0,00	0,00		
<i>mon</i>	p	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,01		0,00	0,00	0,49	
T	p				0,00				0,00				0,00
		ST3				ST4				ST5			
		<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T	<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T
<i>ann</i>	p	0,00				0,00				0,00			
<i>mac</i>	p	0,00	0,00			0,00	0,00			0,00	0,00		
<i>mon</i>	p	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,02		0,00	0,00	0,00	
T	p				0,00				0,00				0,00
		LES											
		<i>aff</i>	<i>ann</i>	<i>mac</i>	T								
<i>ann</i>	p	0,00											
<i>mac</i>	p	0,01	0,00										
<i>mon</i>	p	0,40	0,00	0,119									
T	p				0,00								

Tabla 14. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje de variancia aportado por cada componente para las variables morfológicas cuantitativas de machos y hembras adultos de los cinco clados.

Componente	Eigenvalues iniciales			Extracción de las sumas		
	Total	% Variancia	% Acumulativo	Total	% Variancia	% Acumulativo
1	9,486	63,241	63,241	9,486	63,241	63,241
2	1,571	10,472	73,713	1,571	10,472	73,713

Tabla 15. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje que aporta cada variable morfológica cuantitativa de machos y hembras adultos de los cinco clados.

Variables	Componentes	
	1	2
Número de escamas supraoculares	0,872	-0,228
Número de escamas de la mandíbula superior	0,627	-0,048
Número de escamas de la mandíbula inferior	0,528	0,510
Número de escamas gulares y mandibulares	0,906	-0,057
Número de escamas ventrales	0,749	-0,405
Número de escamas dorsales	0,819	-0,357
Número de escamas temporales	0,820	-0,293
Número de escamas alrededor del cuerpo	0,896	0,252
Número de escamas alrededor de la cola	0,914	0,127
Número de escamas a lo largo de la pata anterior	0,892	-0,038
Número de escamas del tercer dedo de la pata anterior	0,872	-0,147
Número de escamas del quinto dedo de la pata anterior	0,765	0,129
Número de escamas del tercer dedo de la pata posterior	0,863	0,071
Número de escamas del cuarto dedo de la pata posterior	0,885	0,054
Número de escamas del quinto dedo de la pata posterior	0,820	0,212
Número de escamas del párpado inferior	0,339	0,845

Tabla 16. Resultados de la prueba del análisis multivariado de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre machos y hembras adultos de los cuatro clados para las variables morfométricas.

Efecto		Valor	F	Hipótesis df	Error df	p	Eta Cuadrado Parcial
Intercepción	Pillai's Trace	0,028	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
	Wilks' Lambda	0,972	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
	Hotelling's Trace	0,029	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
	Roy's Largest Root	0,029	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
Sexo	Pillai's Trace	0,285	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
	Wilks' Lambda	0,715	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
	Hotelling's Trace	0,399	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
	Roy's Largest Root	0,399	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
Especie	Pillai's Trace	0,064	0,191	64,000	752,000	1,000	0,016
	Wilks' Lambda	0,937	0,190	64,000	726,518	1,000	0,016
	Hotelling's Trace	0,066	0,190	64,000	734,000	1,000	0,016
	Roy's Largest Root	0,041	0,478	16,000	188,000	0,955	0,039
Sexo * Especie	Pillai's Trace	0,434	1,430	64,000	752,000	0,018	0,108
	Wilks' Lambda	0,627	1,437	64,000	726,518	0,017	0,110
	Hotelling's Trace	0,503	1,443	64,000	734,000	0,016	0,112
	Roy's Largest Root	0,235	2,765	16,000	188,000	0,001	0,190

Tabla 17. Resultados de la prueba del análisis multivariado de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variables morfométricas de los cuatro clados de hembras adultos.

Efecto		Valor	F	Hipótesis df	Error df	p	Eta Cuadrado Parcial
Intercepción	Pillai's Trace	0,000	0,000	16,000	87,000	1,000	0,000
	Wilks' Lambda	1,000	0,000	16,000	87,000	1,000	0,000
	Hotelling's Trace	0,000	0,000	16,000	87,000	1,000	0,000
	Roy's Largest Root	0,000	0,000	16,000	87,000	1,000	0,000
Especie	Pillai's Trace	0,000	0,000	48,000	267,000	1,000	0,000
	Wilks' Lambda	1,000	0,000	48,000	259,554	1,000	0,000
	Hotelling's Trace	0,000	0,000	48,000	257,000	1,000	0,000
	Roy's Largest Root	0,000	0,000	16,000	89,000	1,000	0,000

Tabla 18. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje de variancia aportado por cada componente para las variables morfométricas de hembras adultas.

Componente	Eigenvalues iniciales			Extracción de las sumas		
	Total	% Variancia	% Acumulativo	Total	% Variancia	% Acumulativo
1	3,024	18,898	18,898	3,024	18,898	18,898
2	2,048	12,798	31,696	2,048	12,798	31,696
3	1,433	8,957	40,653	1,433	8,957	40,653
4	1,342	8,390	49,043	1,342	8,390	49,043
5	1,197	7,478	56,521	1,197	7,478	56,521
6	1,144	7,149	63,670	1,144	7,149	63,670

Tabla 19. Resultado del análisis de componentes principales que indica el porcentaje que aporta cada variable morfométrica de hembras adultas de los cinco clados.

Variables	Componentes	
	1	2
Ancho de la cabeza	0,603	-0,350
Alto de la cabeza	0,611	-0,427
Longitud de la cabeza	0,772	-0,125
Longitud del húmero	0,142	0,562
Longitud de la ulna	0,301	0,531
Longitud de la palma	0,152	0,375
Longitud del cuarto dedo de la pata anterior	0,416	0,132
Longitud del fémur	0,298	0,503
Longitud de la tibia	0,331	0,598
Longitud de la planta	0,385	0,455
Longitud del cuarto dedo de la pata posterior	0,458	-0,029
Longitud desde el borde anterior de la órbita ocular hasta la punta del hocico	0,552	-0,342
Longitud desde el borde posterior de la órbita ocular hasta el borde anterior del tímpano	0,606	-0,088
Longitud del tímpano	0,294	-0,095
Longitud entre las dos aberturas nasales	0,262	-0,080
Longitud desde el pliegue gular hasta el borde posterior del tímpano	-0,030	0,115

Tabla 20. Resultados de la prueba del análisis multivariado de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variables morfométricas de los cuatro clados de machos adultos.

Efecto		Valor	F	Hipótesis df	Error df	p	Eta Cuadrado Parcial
Intercepción	Pillai's Trace	0,000	0,000	16,000	81,000	1,000	0,000
	Wilks' Lambda	1,000	0,000	16,000	81,000	1,000	0,000
	Hotelling's Trace	0,000	0,000	16,000	81,000	1,000	0,000
	Roy's Largest Root	0,000	0,000	16,000	81,000	1,000	0,000
Especie	Pillai's Trace	0,000	0,000	48,000	249,000	1,000	0,000
	Wilks' Lambda	1,000	0,000	48,000	241,708	1,000	0,000
	Hotelling's Trace	0,000	0,000	48,000	239,000	1,000	0,000
	Roy's Largest Root	0,000	0,000	16,000	83,000	1,000	0,000

Tabla 21. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje de variancia aportado por cada componente para las variables morfométricas de machos adultos

Componente	Eigenvalues iniciales			Extracción de las sumas		
	Total	% Variancia	% Acumulativo	Total	% Variancia	% Acumulativo
1	3,498	21,861	21,861	3,498	21,861	21,861
2	2,315	14,466	36,327	2,315	14,466	36,327
3	1,487	9,294	45,621	1,487	9,294	45,621
4	1,249	7,806	53,427	1,249	7,806	53,427
5	1,111	6,943	60,370	1,111	6,943	60,370
6	1,041	6,506	66,876	1,041	6,506	66,876

Tabla 22. Resultados del análisis de componentes principales que indica el porcentaje que aporta cada variable morfométrica de machos adultos de los cinco clados.

Variables	Componentes	
	1	2
Ancho de la cabeza	0,563	-0,335
Alto de la cabeza	0,683	-0,468
Longitud de la cabeza	0,821	-0,101
Longitud del húmero	0,283	0,603
Longitud de la ulna	0,291	0,504
Longitud de la palma	0,230	0,165
Longitud del cuarto dedo de la pata anterior	0,408	0,504
Longitud del fémur	0,233	0,618
Longitud de la tibia	0,329	0,166
Longitud de la planta	0,218	0,345
Longitud del cuarto dedo de la pata posterior	0,292	0,498
Longitud desde el borde anterior de la órbita ocular hasta la punta del hocico	0,610	0,139
Longitud desde el borde posterior de la órbita ocular hasta el borde anterior del tímpano	0,710	-0,366
Longitud del tímpano	0,460	-0,304
Longitud entre las dos aberturas nasales	0,522	-0,155
Longitud desde el pliegue gular hasta el borde posterior del tímpano	0,039	0,170

Tabla 23. Resultados de la prueba de análisis de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre sexos de la variable morfométrica longitud rostro-cloaca de los cuatro clados.

Efecto		Valor	F	Hipótesis df	Error df	p	Eta Cuadrado Parcial
Intercepción	Pillai's Trace	0,028	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
	Wilks' Lambda	0,972	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
	Hotelling's Trace	0,029	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
	Roy's Largest Root	0,029	0,336	16,000	185,000	0,993	0,028
Especie	Pillai's Trace	0,064	0,191	64,000	752,000	1,000	0,016
	Wilks' Lambda	0,937	0,190	64,000	726,518	1,000	0,016
	Hotelling's Trace	0,066	0,190	64,000	734,000	1,000	0,016
	Roy's Largest Root	0,041	0,478	16,000	188,000	0,955	0,039
Sexo	Pillai's Trace	0,285	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
	Wilks' Lambda	0,715	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
	Hotelling's Trace	0,399	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
	Roy's Largest Root	0,399	4,618	16,000	185,000	0,000	0,285
Taxa* Especie	Pillai's Trace	0,434	1,430	64,000	752,000	0,018	0,108
	Wilks' Lambda	0,627	1,437	64,000	726,518	0,017	0,110
	Hotelling's Trace	0,503	1,443	64,000	734,000	0,016	0,112
	Roy's Largest Root	0,235	2,765	16,000	188,000	0,001	0,190

Tabla 24. Resultados de la prueba del análisis de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variable morfométrica longitud rostro-cloaca de los cuatro clados de hembras adultos.

Género	Especie	Diferencia media	Std. Error	p	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
<i>affinis</i>	<i>annectens</i>	0,8058	1,20624	0,909	-2,3447	3,9564
	<i>macbrydei</i>	-0,1750	1,10370	0,999	-3,0578	2,7078
	<i>montium</i>	0,0048	1,19554	1,000	-3,1178	3,1274
<i>annectens</i>	<i>affinis</i>	-0,8058	1,20624	0,909	-3,9564	2,3447
	<i>macbrydei</i>	-0,9808	1,02419	0,774	-3,6559	1,6942
	<i>montium</i>	-0,8010	1,12255	0,892	-3,7330	2,1309
<i>macbrydei</i>	<i>affinis</i>	0,1750	1,10370	0,999	-2,7078	3,0578
	<i>annectens</i>	0,9808	1,02419	0,774	-1,6942	3,6559
	<i>montium</i>	0,1798	1,01156	0,998	-2,4623	2,8219
<i>montium</i>	<i>affinis</i>	-0,0048	1,19554	1,000	-3,1274	3,1178
	<i>annectens</i>	0,8010	1,12255	0,892	-2,1309	3,7330
	<i>macbrydei</i>	-0,1798	1,01156	0,998	-2,8219	2,4623

Tabla 25. Resultados de la prueba del análisis de variancia que indica si existen o no diferencias significativas entre las variable morfométrica longitud rostro-cloaca de los cuatro clados de machos adultos.

Género	Especie	Diferencia media	Std. Error	p	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
<i>affinis</i>	<i>annectens</i>	3,2756	1,32073	0,069	-0,1776	6,7288
	<i>macbrydei</i>	2,4900	1,04130	0,086	-0,2326	5,2126
	<i>montium</i>	4,0987	1,34548	0,016	0,5808	7,6166
<i>annectens</i>	<i>affinis</i>	-3,2756	1,32073	0,069	-6,7288	0,1776
	<i>macbrydei</i>	-0,7856	1,14892	0,903	-3,7896	2,2184
	<i>montium</i>	0,8230	1,43040	0,939	-2,9169	4,5630
<i>macbrydei</i>	<i>affinis</i>	-2,4900	1,04130	0,086	-5,2126	0,2326
	<i>annectens</i>	0,7856	1,14892	0,903	-2,2184	3,7896
	<i>montium</i>	1,6087	1,17730	0,523	-1,4695	4,6868
<i>montium</i>	<i>affinis</i>	-4,0987	1,34548	0,016	-7,6166	-0,5808
	<i>annectens</i>	-0,8230	1,43040	0,939	-4,5630	2,9169
	<i>macbrydei</i>	-1,6087	1,17730	0,523	-4,6868	1,4695

Tabla 26. Resultados de la evaluación del análisis del Área Bajo la Curva ROC de los cinco modelos de predicción de nicho del género *Pholidobolus*.

Especie	<i>p</i>	Variables bioclimáticas más importantes	Contribución de la variable bioclimática
<i>P. affinis</i>	0,986	BIO13: Precipitación del mes más húmedo	39,8 %
		BIO10: Temperatura media del cuatrimestre más cálido	34,9 %
<i>P. annectens</i>	0,972	BIO6: Temperatura mínima del mes más frío	50,6 %
		BIO4: Estacionalidad de temperatura	15,8 %
<i>P. macbrydei</i>	0,966	BIO10: Temperatura media del cuatrimestre más cálido	64,8 %
		BIO18: Precipitación del cuatrimestre más cálido	18,9 %
<i>P. montium</i>	0,987	BIO8: Temperatura media del cuatrimestre más húmedo	19,4 %
		BIO6: Temperatura mínima del mes más frío	17,8 %
<i>P. prefrontalis</i>	0,981	BIO10: Temperatura media del cuatrimestre más cálido	37 %
		BIO7: Rango de temperatura anual	17,3 %

Tabla 27. Resultados del análisis discriminante que indican el porcentaje de variancia y correlación aportado por cada función para las 19 variables bioclimáticas.

Función	Variabes	Eigenvalue	% Variancia	% Acumulativo	Correlación canónica
1	BIO13	1,791	58,9	58,9	0,801
2	BIO15	0,726	23,9	82,8	0,649

10. ANEXOS

Anexo 1. Lista de individuos colectados durante el estudio y depositados en el Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los números en la primera columna corresponden a los números de las localidades ilustradas en la Figura 2.

	QCAZ	Provincia	Localidad	LatGeo	LonGeo
1	5528	Loja	Camino Loja-Zamora	-3,98417	-79,16806
2	5539	Loja	Camino Loja-Zumbam 128 km al sur de Yangana	-4,42722	-79,16833
3	6006	Chimborazo	Ozogoche	-2,36873	-78,68871
4	6031	Azuay	Vía Oña la Paz	-3,37833	-79,18895
5	6945	Loja	Jimbura, Laguna de Jimbura	-4,70947	-79,43558
6	6946	Loja	Jimbura, Laguna de Jimbura	-4,70947	-79,43558
7	6949	Loja	Fierro Urco	-3,71069	-79,30864
8	6950	Loja	Fierro Urco	-3,71069	-79,30864
9	7266	Tungurahua	Chamisa, Vía a Guadalupe	-1,36	-78,51
10	7891	El Oro	Guanazán	-3,47421	-79,47437
11	7894	El Oro	Guanazán	-3,47421	-79,47437
12	8008	Azuay	Cuenca, Bosque Protector Mazan	-2,87522	79,12923
13	8010	Azuay	Parque Nacional El Cajas, sendero a la población de Patul	-2,74105	-79,23479
14	8013	Azuay	Cuenca, Bosque Protector Mazan	-2,87522	-79,12923
15	8053	Cotopaxi	Alrededores de San Juan de Pasto Calle	-0,75101	-78,64763
16	8054	Cotopaxi	Alrededores de San Juan de Pasto Calle	-0,75101	-78,64763
17	8056	Cotopaxi	2 km S Chugchilán vía al Quilotoa	-0,80672	-78,93626
18	8057	Cotopaxi	2 km S Chugchilán vía al Quilotoa	-0,80672	-78,93626
19	8058	Cotopaxi	2 km S Chugchilán vía al Quilotoa	-0,80672	-78,93626
20	8510	Azuay	Girón, Parroquia San Gregorio, Páramo de Quinsacocha	-3,10599	-79,21789
21	8511	Azuay	Girón, Parroquia San Gregorio, Páramo de Quinsacocha	-3,10599	-79,21789
22	8512	Azuay	Tarqui	-3,01588	-79,04448
23	8646	Zamora Chinchipe	Piuntza, A los alrededores del río Piuntza, Vía a Sigsig - Gualaquiza	-3,11	-78,80
24	8647	Zamora Chinchipe	Piuntza, A los alrededores del río Piuntza, Vía a Sigsig - Gualaquiza	-3,11	-78,80
25	8651	Loja	Saraguro, km 26 Vía Loja - Saraguro, Bosque nativo Huashapamba	-3,66	-79,27
26	8893	Azuay	Parque Nacional El Cajas, Cuenca y alrededores (Provincia del Azuay y Cañar), Río Patul	-2,69360	-79,23219
27	8900	Azuay	Parque Nacional El Cajas, Cuenca y alrededores (Provincia del Azuay y Cañar), Quebrada río Zhurcay	-3,04155	-79,21567
28	8906	Azuay	Girón, Parroquia San Gregorio, Páramo de Quinsacocha	-3,04155	-79,21567
29	9044	Pichincha	Tababela, Nuevo Aeropuerto Internacional de Quito, sector línea de descarga	-0,11015	-78,35971
30	9214	Chimborazo	Atillo Grande, Laguna Magdalena, Páramo de Pajonal	-2,18742	-78,50686

Anexo 1. Continuación

31	9216	Chimborazo	Atillo Grande, Laguna Frutitán	-2,21584	-78,50136
32	9218	Chimborazo	Atillo Grande, Laguna Frutitán	-2,21584	-78,50136
33	9605	Azuay	Sigsig Carretera, Pared a las afueras de Sigsig 2574 msnm	-3,05477	-78,78863
34	9606	Azuay	Gualaceo, Afueras de Gualaceo	-2,88216	-78,77536
35	9612	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Culebrillas, Parque Nacional Sangay	-1,96094	-78,43199
36	9616	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Comunidad Etén, Sector Timbo	-1,92922	-78,53718
37	9619	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Comunidad Etén, Sector Timbo	-1,92922	-78,53718
38	9621	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Comunidad Etén, Sector Timbo	-1,92922	-78,53718
39	9626	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Comunidad Melán	-1,87502	-78,54773
40	9627	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Comunidad Melán	-1,87502	-78,54773
41	9628	Chimborazo	Riobamba, Pungalá, Comunidad Melán	-1,87502	-78,54773
42	9639	Cotopaxi	Mulaló	-0,77648	-78,57766
43	9641	Cotopaxi	San Miguel de Salcedo, Río Cutuchi, cerca de la Urbanización Rumipamba	-1,03586	-78,59814
44	9642	Cotopaxi	Latacunga	-0,87410	-78,64055
45	9683	Imbabura	Reserva Cotacachi-Cayapas Cerca de Laguna Cuicocha, camino de piedras al mirador	0,29282	-78,35152
46	9685	Imbabura	Reserva Cotacachi-Cayapas Cerca de Laguna Cuicocha, sendero	0,29347	-78,35215
47	9686	Imbabura	Reserva Cotacachi-Cayapas Cerca de Laguna Cuicocha, sendero	0,29312	-78,35486
48	9691	Pichincha	Alambi Cerro de Alambi	-0,07626	-78,58083
49	9839	Tungurahua	Cotaló, sendero a Comunidad Mucubí	-1,42951	-78,51743
50	9843	Tungurahua	San Miguelito sendero a Pilla	-1,21603	-78,52841
51	9844	Tungurahua	San Miguelito sendero a Pilla	-1,22011	-78,52526
52	9848	Tungurahua	Patate, Loma centro de Patate	-1,31161	-78,50987
53	9849	Tungurahua	Patate, Loma centro de Patate	-1,31161	-78,50987
54	9850	Tungurahua	Patate, Cerro cerca a gasolinera	-1,31115	-78,51417
55	9895	Tungurahua	400 m Panamericana - Santa Lucía, 6 km N Mocha	-1,36683	-78,65443
56	9896	Tungurahua	400 m Panamericana - Santa Lucía, 6 km N Mocha	-1,36683	-78,65443
57	9897	Tungurahua	400 m Panamericana - Santa Lucía, 6 km N Mocha	-1,36683	-78,65443
58	9899	Chimborazo	Colta (Cajabamba)	-1,69897	-78,77365
59	9900	Chimborazo	Colta (Cajabamba)	-1,69897	-78,77365
60	9901	Chimborazo	Colta (Cajabamba)	-1,69897	-78,77365
61	9908	Chimborazo	Alausí	-2,19839	-78,84522
62	9909	Chimborazo	Alausí	-2,19839	-78,84522
63	9911	Chimborazo	Alausí	-2,19839	-78,84522
64	9914	Azuay	Guablid, 2 km vía Guachapla - Sevilla de Oro	-2,77488	-78,69758
65	9919	Azuay	Guablid, 2 km vía Guachapla - Sevilla de Oro	-2,77488	-78,69758
66	9920	Azuay	Guablid, 2 km vía Guachapla - Sevilla de Oro	-2,77488	-78,69758

Anexo 1. Continuación

67	9932	Azuay	20 km Cuenca - Cajas	-2,77744	-79,17001
68	9936	Azuay	20 km Cuenca - Cajas	-2,77744	-79,17001
69	9938	Azuay	20 km Cuenca - Cajas	-2,77744	-79,17001
70	9947	Cañar	Cañar	-2,56076	-78,93078
71	9951	Chimborazo	Tixán	-2,15616	-78,80090
72	9952	Chimborazo	Tixán	-2,15616	-78,80090
73	9953	Chimborazo	Tixán	-2,15616	-78,80090
74	9996	Tungurahua	Caserío Poatug, Sector El Corral	-1,27250	-78,46805
75	9997	Tungurahua	Caserío Poatug, Sector Terremoto	-1,27297	-78,49149
76	9998	Tungurahua	Caserío Poatug, Sector Terremoto	-1,27297	-78,49149
77	10016	Tungurahua	Caserío Poatug, Sector Aya Samana	-1,28285	-78,49128
78	10049	Cañar	Sector Quebrada Guallicanga	-2,43211	-78,90223
79	10050	Cañar	A 1000 m de la Panamericana Juncal	-2,47319	-78,97290
80	10051	Cañar	Río Guallicanga, quebrada Juncal	-2,49000	-78,97290
81	10052	Cañar	Río Guallicanga, quebrada Juncal	-2,49000	-78,97290
82	10054	Loja	Bosque Protector Colambo Yacuri, sendero a la Laguna Simbura (Negra)	-4,70947	-79,43558
83	10133	Azuay	Cochapamba	-2,79712	-79,41563
84	10134	Azuay	Cochapamba	-2,79712	-79,41563
85	10135	Azuay	Cochapamba	-2,79712	-79,41563
86	10269	Loja	Base militar (Guachaurco)	-4,03328	-79,87350
87	10281	Loja	Base militar (Guachaurco)	-4,03524	-79,87140
88	10284	Loja	Guachaurco	-4,03744	-79,87006
89	10330	Loja	Huajala	-4,09480	-79,97689
90	10333	Loja	Huajala	-4,09480	-79,97689
91	10335	Loja	Huajala	-4,09480	-79,97689

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN con tiocianato de guanidina**A. Lisis de células y desnaturalización del RNAsa**

1. Calentar el Buffer de lisis a 55°C para que el SDS vuelva a estar en solución (poner en la estufa o microondas por aproximadamente 20 segundos).
2. Macerar 10mg de tejido (músculo o hígado) en un portaobjetos con una guillete estéril o bisturí.
3. Colocar 300ul de Buffer de lisis en un tubo de 1.5ml.
4. Transferir el tejido macerado al tubo que contiene el buffer de lisis, añadir 3ul de proteinasa K (20mg/ul) y dar un breve vórtex.
5. Incubar la muestra a 55°C de 3-6 horas (preferiblemente un día) hasta que el tejido esté completamente macerado. Se debe agitar la muestra cada 30-60 minutos.
6. A las 6 horas o al día siguiente se debe homogenizar la muestra con un breve vórtex.
7. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente por algunos minutos.

B. Precipitación de proteínas

8. Añadir 100ul de Solución de Precipitación a la muestra de tejido macerado y dar vórtex por 10-20 segundos.
9. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos (preferiblemente 15 minutos). Repetir si es que no se ha formado un pellet firme.
10. Decantar o pipetear el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5ml (contiene ADN), descartar el pellet que contiene proteínas y demás desechos.

C. Precipitación de ADN

11. Añadir 300ul de Isopropanol frío al 100% a la solución con ADN, mezclar el tubo cuidadosamente invirtiéndole varias veces.
12. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
13. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN.
14. Añadir 300ul de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
15. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y descartar el etanol.

Anexo 2. Continuación

16. Dejar evaporar el remanente de etanol a temperatura ambiente por 20-30 minutos, con el tubo abierto. No dejar más tiempo pues se puede deshidratar demasiado el pellet y será más difícil rehidratarlo.

D. Tratamiento con NAOAc, rehidratación y almacenamiento del ADN

17. Añadir 100ul de 10mMTris-HCl, pH8, al pellet y mezclar. Debe resuspenderse completamente (24 horas), guardar en la refrigeradora a 4°C.
18. Al siguiente día añadir 10ul de 3M NaOAc (previamente calentado por 10 minutos a 70°C en la incubadora) y 100ul de isopropanol frío al 100%, invertir el tubo varias veces.
19. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante.
20. Añadir 300ul de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
21. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y descartar el etanol.
22. Dejar evaporar el remanente de etanol a temperatura ambiente por 20-30 minutos, con el tubo abierto. No dejar más tiempo pues se puede deshidratar demasiado el pellet y será más difícil rehidratarlo.
23. Resuspender el pellet añadiendo 50ul de 1XTE pH8.
24. Guardar este stock a -20°C. Alícuotas de mayor dilución en dH₂O se pueden guardar a 4°C.

Anexo 3. Protocolo de electroforesis en gel de agarosa y tinción de ADN con sybr safe

1. Pesar 1gr de agarosa (en polvo).
2. Colocar la agarosa en un erlen meyer y añadir 100ml de Buffer TBE 0.5X, mezclar.
3. Calentar el erlen meyer en el microondas por 1 minuto aproximadamente hasta que se disuelva bien.
4. Coger con guante el erlen meyer y dejar enfriar algunos minutos.
5. Armar el recipiente de tinción y colocar la peinilla adecuada en un extremo.
6. Añadir el gel en el recipiente desde un extremo, teniendo cuidado de no formar burbujas y dejar aproximadamente una media hora a temperatura ambiente hasta que se solidifique el gel. A la media hora puede guardarse el gel en la refrigeradora a 4°C por 10 minutos.
7. Una vez sólido el gel (tocar un extremo para comprobar), retirar la peinilla.
8. Recortar un trozo de parafina y colocar 1.5ul de tinte blue/orange (permanece en la refrigeradora a 4°C) por cada muestra.
9. Mezclar cuidadosamente el tubo que contiene el ADN y extraer 2,5ul con la pipeta, añadir al tinte y mezclar con la misma pipeta. Recoger con la pipeta la gota formada y colocar cuidadosamente en el pocillo del gel.
10. Realizar el paso 9 con las otras muestras, en un pocillo de al lado colocar 2,5ul de 100pb de ADN ladder.
11. Colocar el recipiente con el gel (previamente quitar los dos cauchos) en la máquina de electroforesis que contiene buffer TBE 0.5X y correr por 40 minutos a 90V.
12. Posteriormente, recortar con la espátula el gel que contiene las muestras y colocarle en un recipiente que contiene sybr safe (10 µl), el cual está dentro de una caja cubierta de aluminio que impide la desnaturalización del sybr safe por efecto de la luz. El resto del gel guardar en el erlen meyer y tapar con aluminio para que no se deshidrate.
13. Colocar la caja en el mezclador por 30 minutos a 15 rpm.
14. Finalmente observar el gel en el transiluminador de luz UV.
15. Reutilizar el gel hasta 5 veces.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Paola Micaela Mafla Endara, C.I. 1721598959, autora del trabajo de graduación titulado: “Filogeografía de las lagartijas andinas del género *Pholidobolus* (Squamata: Gymnophthalmidae) en Ecuador” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

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

Quito, 29 de Junio del 2011

Srta. Paola Micaela Mafla Endara

C.I. 1721598959