



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA ECOSISTEMAS

**PATRONES DE DIVERGENCIA Y DIVERSIDAD DE LAS RANAS
GLADIADORAS (BOANA SPP.) DE LA GRAN SABANA
VENEZOLANA EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN ECOSISTEMAS

AUTORA: MICKAELA ELIZABETH GALLO CAMACHO

TUTORA: PhD. ERY O. FUKUSHIMA

COTUTORA: PhD. PATRICIA E. SALERNO

Napo - Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Mickaela Elizabeth Gallo Camacho, con documento de identidad N°1501003857, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Ecosistemas, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 11 de noviembre de 2022



Mickaela Elizabeth Gallo Camacho

C.I: 1501003857

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Mickaela Elizabeth Gallo Camacho, con documento de identidad N° 1501003857, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "Patrones de divergencia y diversidad de las ranas gladiadoras (*Boana* spp.) de la Gran Sabana venezolana en un gradiente altitudinal" de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 11 de noviembre de 2022



Mickaela Elizabeth Gallo Camacho

C.I: 1501003857

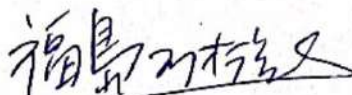
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: "Patrones de divergencia y diversidad de las ranas gladiadoras (*Boana* spp.) de la Gran Sabana venezolana en un gradiente altitudinal", en la modalidad: artículo, fue realizado por: Mickaela Elizabeth Gallo Camacho, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 11 de noviembre de 2022

Firma:



Ery Odette Fukushima

C.I: 1759301714

Firma:



PATRICIA
ELENA

Patricia Elena Salerno Domínguez

C.I: 1759267857

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Miguel y Nanci. Gracias por todo su amor y apoyo, por ser luz en mis días de tinieblas, por enseñarme a luchar por lo que quiero.

A Mimi, razón de mi alegría, motivación y sonrisas.

Sin ustedes no hubiera sido posible llegar tan lejos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutoras Patricia y Ery por su paciencia y sabiduría, porque fueron mis cómplices en este trajinar de conocimientos e investigación, mientras compartieron su profesionalismo en el proceso de desarrollo y ejecución de este trabajo.

A los docentes que caminaron junto a mí durante esta etapa universitaria, brindándome su experiencia y apoyo hasta llegar a la meta deseada.

A mis amigos, quienes me acompañaron a lo largo de esta vida universitaria y a los familiares que impactaron positivamente en mí.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
GLOSARIO DE TERMINOLOGÍA	ix
GLOSARIO DE SIGLAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
MÉTODOS	3
Muestreo de individuos	3
Preparación de la biblioteca ddRAD, secuenciación y genotipado	4
Visualización y edición de SNPs	5
Estructura de la población	5
Diversidad genómica y endogamia entre poblaciones de <i>Boana jimenezi</i>	6
Historia filogeográfica	6
RESULTADOS	6
Análisis de Componentes Principales (PCA) entre las <i>Boana</i> spp. de la Gran Sabana	6
Análisis de Componentes Principales (PCA) de <i>Boana jimenezi</i> en un gradiente altitudinal	7
Probabilidad de asignación grupal de individuos (compoplot) entre las <i>Boana</i> spp. de la Gran Sabana	9

Probabilidad de asignación grupal de individuos (compoplot) de la especie <i>Boana jimenezi</i> en un gradiente altitudinal	10
Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) entre las <i>Boana</i> spp. de la Gran Sabana	12
Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de <i>Boana jimenezi</i> en un gradiente altitudinal	13
Historia filogeográfica	15
Índice de fijación por pares (pairwise Fst) entre las <i>Boana</i> spp. de la Gran Sabana	17
Diversidad genómica y endogamia entre poblaciones de <i>Boana jimenezi</i>	19
Coancestría individual	19
DISCUSIÓN	20
Aislamiento de una población de <i>Boana jimenezi</i> (localidad de la cima)	20
Identidad taxonómica de <i>Boana sibleszi</i>	22
Divergencia en <i>Boana lemai</i>	23
Diversidad genómica y potencial adaptativo	24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
REFERENCIAS	27
ANEXOS	33

GLOSARIO DE TERMINOLOGÍA

Término	Definición
ADN	El ácido desoxirribonucleico, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus.
Auyantepui	Es el tepui más grande, famoso y visitado de Venezuela. Ubicado en la parroquia Santa Elena de Uairén del Municipio Gran Sabana del estado Bolívar, dentro del Parque Nacional Canaima.
Cariotipo	Es el conjunto completo de los cromosomas de un individuo.
Clado	Es como se denomina en la cladística a cada una de las ramificaciones que se obtiene después de hacer un único corte en el árbol filogenético.
Clúster	Es el conjunto o grupo de cosas similares posicionadas o que ocurren de manera cercana entre sí.
Coancestría	Es la probabilidad de que dos genes tomados al azar del mismo locus de dos individuos, también tomados al azar de la población, sean idénticos por descendencia.
Compoplot	Es la probabilidad de asignación grupal de individuos a varios grupos.
Efecto Wahlund	Es la reducción en la heterocigosidad causada por la estructura de una subpoblación.
Eigenvalues	También llamados vectores propios, eigenvectores o autovectores. Son los vectores no nulos que, cuando son transformados por el operador, dan lugar a un múltiplo escalar de sí mismos, con lo que no cambian su dirección.
Especies crípticas	Especie diferente que muestra poca o ninguna diferenciación morfológica y por lo tanto es difícil de distinguir.
Filogenia	Origen, formación y desarrollo evolutivo general de una especie biológica.
Genetic admixture	También llamada mezcla genética. Es la generación de una nueva población híbrida mediante la mezcla de dos o más poblaciones ancestrales que habían estado previamente aisladas.
Heterocigosidad	Número de individuos heterocigotos para un locus dividido entre el número total de individuos de la muestra.
Hibridación	Es la cruce entre individuos de dos poblaciones o grupos de poblaciones diferenciados entre sí en uno o más caracteres heredables.
Holotipo	En taxonomía, un holotipo es un ejemplar físico único de un organismo, que se sabe que se usó cuando la especie se describió formalmente.
Índice de fijación	Es una medida de la diferenciación de la población debido a la estructura genética.
Island hopping	Es el cruce mediante una serie de viajes más cortos entre islas, a diferencia de un solo viaje directo al destino.
Linaje	Es una secuencia de especies que forman una línea directa de descendencia, siendo cada nueva especie el resultado directo de la evolución desde una especie ancestral inmediata.
Locus	Es el lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN, como su dirección genética. El plural de locus es "loci".
Marcador molecular	Es una molécula contenida dentro de una muestra tomada de un organismo u otra materia.
Monofilético	En filogenia, un grupo es monofilético si todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de una población ancestral común, y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo.
Morfotipo	En taxonomía, se llama morfotipo al grupo de organismos que no puede diferenciarse a simple vista o con herramientas sencillas, como una lupa de mano, en sus taxones respectivos.
Paratipo	En taxonomía, un paratipo es cada uno de los ejemplares de la serie tipo que no es ni el holotipo ni el isotipo, ni uno de los sintipos si en el protocolo se designaron simultáneamente dos o más especímenes como tipos.
Potencial de adaptación	Capacidad de una población o especie desarrolle cambios a nivel genético en los rasgos frente a cambios ambientales.

Roraima	Es el tepui más alto con 2810 msnm., considerado como el punto más alto de la cadena de mesetas tepuis de la sierra de Pacaraima, en América del Sur.
Sinapomorfias	Es el estado de carácter apomórfico cuando se presenta en dos o más taxones.
Valor de K	K-means es un algoritmo de clasificación no supervisada (clusterización) que agrupa objetos en k grupos basándose en sus características. El agrupamiento se realiza minimizando la suma de distancias entre cada objeto y el centroide de su grupo o clúster.

Realizado por: Gallo, 2022.

GLOSARIO DE SIGLAS

Término	Definición
BIC	Criterio de Inferencia Bayesiana.
DAPC	Análisis Discriminante de Componentes Principales.
F_{IS}	Coeficiente de consanguinidad.
H_e	Heterocigosidad esperada.
H_o	Heterocigosidad observada.
NaN	Not a number.
PC	Componente Principal.
PCA	Análisis de Componente Principal.
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (SNP) es una variante genómica en la posición de una base única en el ADN.

Realizado por: Gallo, 2022.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.1: Índice de fijación por pares (pairwise F_{st}) (Nei, 1987) entre las <i>Boana</i> spp. de seis localidades de la sabana, dos de la ladera y una de la cima del Auyantepui	18
Tabla No.2: Diversidad genética de <i>B. jimenezi</i> . Los 33 individuos pertenecen a cuatro localidades	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.1: Localidad de las 35 muestras de <i>Boana jimenezi</i> recolectadas en la Gran Sabana venezolana en el gradiente altitudinal	4
Figura No.2: Estructura de la población a partir del PCA	8
Figura No.3: Estructura de la población a partir del compoplot	12
Figura No.4: Estructura de la población a partir del DAPC (lado izquierdo) y BIC (lado derecho)	14
Figura No.5: Árbol de inferencia bayesiano basado en los 39 individuos mediante el programa RAxML-NG	16
Figura No.6: Coancestría genómica de las poblaciones de <i>Boana jimenezi</i> en cinco localidades de la Gran Sabana venezolana	20

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: LOCALIDAD Y ZONA DE ESTUDIO DE LAS 49 MUESTRAS RECOLECTADAS.

ANEXO B: LOCALIDAD DE LAS 41 MUESTRAS DEL GÉNERO *BOANA* RECOLECTADAS EN EL GRADIENTE ALTITUDINAL.

RESUMEN

Los tepuis son grandes formaciones montañosas cuyas cumbres se elevan desde los 1500-3000 m de altura. Son considerados como un laboratorio natural debido a los enormes niveles de endemismos, sin embargo, el origen de la flora y fauna aún es un misterio. Gracias a la genética molecular que posee múltiples aplicaciones en la biología de la conservación, el uso y aplicación de marcadores moleculares nos brinda información más precisa sobre los organismos, mientras entendemos el comportamiento, la historia evolutiva, geográfica y ecológica de la especie. El objetivo de este trabajo fue examinar los patrones de divergencia y diversidad de las ranas gladiadoras (*Boana* spp.) de la Gran Sabana venezolana, con ayuda de herramientas ómicas y en un gradiente altitudinal. Para el estudio contamos con un muestreo de 41 individuos con enfoque en *Boana jimenezi* a lo largo del gradiente altitudinal (tierras bajas, medias y altas) y un total de 463 marcadores moleculares, resultado de una secuenciación de ADN asociada al sitio de restricción de doble digestión (ddRADseq). La estructura genética de la población se estimó en R-Studio con ayuda de la paquetería *adegenet* y *hierfstat* para obtener la diversidad genómica de las poblaciones utilizando marcadores genéticos; la historia filogeográfica de *Boana* se obtuvo a partir del programa RAXML-NG para inferir un árbol de máxima verosimilitud con bootstraps. Los análisis revelaron que la población de la cima del Auyantepui (El Oso) está bastante aislada de las poblaciones de tierras medias y bajas, mientras que la población de *B. sibleszi* resultó ser parte de la especie *B. jimenezi*.

Palabras clave: divergencia genética, diversidad genética, estructura poblacional, mezcla genética, SNPs.

ABSTRACT

The tepuis are large mountain formations whose summits rise from 1500-3000 m high. They are considered a natural laboratory due to the enormous levels of endemism, however, the origin of the flora and fauna is still a mystery. Thanks to molecular genetics, which has multiple applications in conservation biology, the use and application of molecular markers provides us with more precise information about organisms, which aids in understanding behavioural, evolutionary, geographical and ecological history of species. The objective of this work was to examine the divergence and diversity patterns of gladiator tree frogs (*Boana* spp.) of The Great Savannah of Venezuela, with the help of omics tools and in an altitudinal gradient. For the study, we had a sample of 41 individuals with focus on *Boana jimenezi* along the altitudinal gradient (low, middle and high lands) and a total of 463 molecular markers, the result of a double-digest restriction site-associated DNA sequencing (ddRAD-Seq). The genetic structure of the population was estimated in R-Studio with the help of the *adegenet* and *hierfstat* packages to obtain the genomic diversity of the populations using genetic markers; the phylogeographic history of *Boana* was obtained using RAxML-NG to infer a maximum likelihood tree with bootstrap support values. Analyses revealed that the population of the Auyantepui summit (El Oso) is quite isolated from the mid and lowland populations, while the population of *B. sibleszi* turned out to be part of the species *B. jimenezi*.

Keywords: genetic divergence, genetic diversity, population structure, admixture, SNPs.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático es una amenaza latente no solo para los seres humanos, sino también para las especies y ecosistemas [1]. La pérdida de biodiversidad es rápida y continua [2], amenaza los ecosistemas [3], provocando un desequilibrio producto de la fragmentación [4]. La conservación de las especies depende, en gran parte, de la variabilidad genética [5], lo que permite la evolución de las especies debido a que, en cada generación, apenas una parte de la población sobrevive y se reproduce compartiendo características particulares a su progenie [6].

Un lugar donde es posible estudiar el origen de los ecosistemas neotropicales y la evolución de la biota son los tepuis, una zona con alto potencial para la investigación y considerada como un laboratorio natural [7]; ideal para llevar a cabo análisis desde una perspectiva ecológica, geográfica y su relación evolutiva. Los tepuis son formaciones montañosas con características únicas a causa de su aislamiento topográfico [8], sus cumbres se elevan desde los 1500-3000 metros de altura y cubren una superficie aproximada de 5000 km² [9,10]; debido a su riqueza y composición taxonómica general, la definen como una unidad zoogeográfica porque alberga gran diversidad y endemismos [8,11–13].

La diversidad y endemismos de estas cumbres son producto de varios procesos evolutivos y ecológicos [14], debido a que la mayoría de linajes y clados que se encontraron sólo existen en dicha área [8]. Los tepuis de inmensas cumbres y escarpadas laderas no son los únicos que muestran una riqueza biológica singular. Las tierras bajas adyacentes, las cuales se encuentran envueltas entre bosques y ligeras formaciones herbáceas han demostrado tener una vida animal y vegetal rica y diversificada [9]. Es posible que el tipo de vegetación sea consecuencia de la mezcla entre la compleja historia geológica y un patrón de paisaje pedológico-geomorfológico bien marcado en todos los niveles altitudinales [10].

Las exploraciones en los últimos treinta años resultan ser importantes para el descubrimiento de nuevas especies de reptiles y anfibios dentro del Escudo Guayanés [14]. La herpetofauna de la Guayana parece estar vinculada a la heterogeneidad espacial y al gradiente altitudinal. La variación del patrón ecológico es gradual y continuo

en ciertas áreas, pero abrupto en otras, debido a los empinados acantilados característicos de algunos tepuis [15].

Gran cantidad de estas cumbres, particularmente en la región de la Gran Sabana donde se halla la formación rocosa Roraima, se encuentran aisladas topográfica y ecológicamente de sus pendientes, las condiciones ambientales distintas en áreas adyacentes dan lugar a las populares islas del cielo [16]. Muchas de estas cumbres a pesar de su aislamiento geográfico inherente, poseen un alto número de endemismos de anfibios, las especies que habitan se cree son de amplia distribución altitudinal, encontrándose desde las tierras bajas/medias (~600-1000 m) hasta las cumbres de estas formaciones (3000 m) [9].

Un ejemplo es la especie *Boana jimenezi*, la cual se ha reportado en múltiples alturas [17], desde la cima del Auyantepui hasta un bosque de galería a lo largo de un pequeño arroyo [17]; posee cierta peculiaridad, es similar morfológicamente a *B. punctata* y podría estar emparentado con *B. sibleszi* [18]. *Boana jimenezi* es una de las pocas especies de amplia distribución altitudinal, hasta el momento no se tiene conocimiento de la conexión de estas poblaciones y qué factible sería que estos pequeños organismos como las ranas puedan subir y bajar los tepuis con facilidad.

El género *Boana* fue reasignado junto a otras especies del género *Hypsiboas* en el año 2017 luego de una revisión de la familia Hylidae [18,19]. Comprende más de 90 especies [20], compuesta de ocho grupos sudamericanos [18]. Los individuos de este género son conocidos como "ranas gladiadoras" las cuales son parte de un clado monofilético con alto soporte filogenético [21], pero sin sinapomorfias morfológicas establecidas [18].

El uso y aplicación de marcadores moleculares brinda información sobre componentes primordiales de la conservación como la historia evolutiva, demográfica, ecológica y el comportamiento de las especies [22]. Mediante técnicas moleculares es posible analizar las posiciones que ocupan los genes a lo largo de un cromosoma (distintos loci) y como éstas constituyen puntos de referencia dentro del genoma (marcadores moleculares) [23]. El SNP (por sus singlas en inglés: Single Nucleotide Polymorphism) o polimorfismo de un solo nucleótido es un marcador molecular [24], con alto potencial para revelar la historia evolutiva de las poblaciones y hacer análisis de especiación, demografía histórica y de genética de la conservación.

Para reconstruir la historia evolutiva, el origen y los impulsores de diversificación de los anfibios y reptiles de las tierras altas [25], así como entender las amenazas que estos puedan enfrentar a futuro, en este estudio se propone examinar los patrones de divergencia y diversidad de las ranas gladiadoras (*Boana* spp.) de la Gran Sabana venezolana, con ayuda de herramientas ómicas y en un gradiente altitudinal.

MÉTODOS

Muestreo de individuos

Las colectas fueron realizadas por Patricia E. Salerno en junio del año 2009 y junio de 2011 en la Gran Sabana venezolana dentro de la región geológica del Escudo Guayanés. Se colectaron 49 individuos de ranas gladiadoras (*Boana*) de cuatro especies distintas y una sin identificación: *B. jimenezi* (N = 35), *B. sibleszi* (N = 6), *B. roraima* (N = 4), *B. lemai* (N = 3) y *B. sp* (N = 1) (ANEXO A).

El muestreo tuvo un enfoque en *Boana jimenezi* (Figura No.1). Las muestras fueron colectadas en cinco distintas localidades: Chivatón, Kavanayen y La Escalera (tierras bajas; 300 - 800 m), Guayaraca (tierras medias; 800 - 1500 m) y El Oso, cima del Auyantepui (tierras altas; > 1500 m). A partir de los especímenes colectados, se extrajo el ADN genómico utilizando el kit de sangre y tejido Qiagen DNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

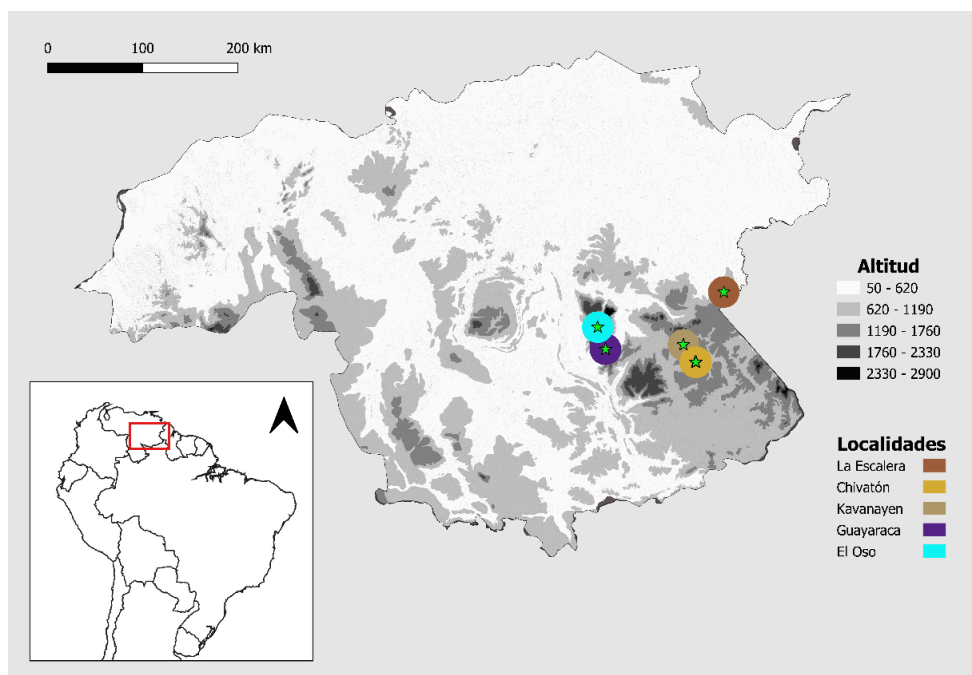


Figura No.1: Localidad de las 35 muestras de *Boana jimenezi* recolectadas en la Gran Sabana venezolana en el gradiente altitudinal.
Realizado por: Gallo, 2022.

El mapa fue creado con QGIS versión 3.10.8 [26]. Los colores de las localidades fueron asignados de acuerdo a la ubicación de cada individuo muestreado, la gama del color café corresponde a las localidades de la sabana (tierras bajas; 300 a 800 m), la gama del morado para la zona de la ladera (tierras medias; 800 a 1500 m) y el color celeste para los que se encontraban en la cima (tierras altas; >1500 m).

Preparación de la biblioteca ddRAD, secuenciación y genotipado

Esta sección fue previamente realizada por Patricia E. Salerno. Se siguió el método ddRADseq [27] para construir bibliotecas de ADN de fragmentos cortos distribuidos a lo largo del genoma y se obtuvieron secuencias mediante un secuenciador Illumina HiSeq 2500 (extremo emparejado, química de 2×150 pb) [28].

Para genotipificar (generar y exportar los loci) las secuencias de ddRAD se utilizó el programa STACKS [29]. Luego se utilizó el programa vcftools (en formato: ped y map) para filtrar la matriz de SNPs y generar una nueva matriz con menor número de datos faltantes.

Luego de los filtros, se retuvieron los loci presentes en más de 75% de individuos, los individuos con más del 50% de loci genotipados, y finalmente se filtraron loci con frecuencia alélica menor de 0.02. Los SNPs comprendidos en la matriz filtrada contienen 463 marcadores y una matriz de 88% de datos completos. A pesar de que se colectaron

muestras de 49 individuos (de base genómica), sólo se retuvieron 41 genotipos debido a una calidad de secuenciación altamente variable entre individuos.

Visualización y edición de SNPs

Para la visualización y edición de matrices de SNPs se usó la aplicación de escritorio del editor de texto Atom 1.58 [30], un editor de código fuente construido utilizando tecnologías web [31]. Esto permitió visualizar la matriz principal de SNPs que contenía 463 marcadores, 885 alelos y 41 individuos divididos por especie y localidad (ANEXO B): 35 individuos de la especie *B. jimenezi* ubicados en Kavanayen, Escalera, Chivatón, Salto Ángel, Guayaraca y El Oso; 3 de *B. roraima* en Salto Ángel (Figura No.2c); 2 de *B. lemai* en Kavanayen y La Escalera; y 1 de *B. sibleszi* en Pacheco. Con la ayuda de la misma aplicación se duplicó la matriz original y se conservó únicamente los datos de *B. jimenezi* en las distintas localidades, la matriz secundaria contenía 463 marcadores, 623 alelos y 35 individuos.

Estructura de la población

La estructura genética de la población de ambas matrices se estimó en RStudio 4.0.4 [32], una aplicación para realizar análisis estadísticos y gráficos en el software libre R [33]. Se utilizó la paquetería *adeigenet* [34,35], aplicando las funciones de Análisis de Componentes Principales (PCA) donde un grupo de variables correlacionadas se transforma en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas e intenta minimizar la dimensionalidad en la cual se expresa el conjunto original de variables [34,36,37].

El Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) [38], es un método multivariante que trata de sintetizar la diferenciación genética entre grupos, mientras ignora la variación dentro del grupo; es decir, el método busca la mejor discriminación de individuos en grupos predefinidos [38]. Para corroborar el número de conglomerados identificados en la gráfica anterior se aplicó el Criterio de Inferencia Bayesiana (BIC) [39], el cual detecta el número real de clústeres (K) que componen un conjunto de datos dentro de la estructura y el valor de K (k means) que usa el BIC para determinar el número de clústeres en el agrupamiento basado en particiones [40–43]. Y la probabilidad de asignación grupal de individuos a varios grupos (compoplot) [34], una manera global de visualizar la composición genotípica de todos los individuos de forma similar al conocido programa STRUCTURE [44].

Debido a la alta sensibilidad de estos análisis a la variabilidad presente en los datos, los pasos anteriormente descritos se repitieron reiteradas ocasiones para identificar secuencias o especies altamente divergentes y eliminarlas del siguiente análisis. Así mismo, estos análisis se efectuaron para la especie *B. jimenezi* de manera individual para observar más a detalle la estructura poblacional únicamente de este grupo.

Diversidad genómica y endogamia entre poblaciones de *Boana jimenezi*

Para obtener la diversidad genómica de las poblaciones de *B. jimenezi* se usó el paquete *hierfstat* de R, el cual está destinado al análisis de la estructura poblacional utilizando marcadores genéticos, tanto para datos haploides como diploides [45]. Con este paquete se estimó el índice de fijación por pares (pairwise F_{st}), la consanguineidad (F_{is}), heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para cada una de las poblaciones. Para este análisis se excluyó la población de La Escalera debido al bajo número de individuos ($N = 2$).

Historia filogeográfica

Para estimar la historia filogeográfica de las *Boana* spp., se utilizó el programa RAxML-NG para inferir un árbol de máxima verosimilitud con bootstraps como valores de confianza de los estimados de los árboles [46]. Se generaron un total de 1000 inferencias de bootstrapping por cada set de datos, y se obtuvieron un total de 10 inferencias de máxima verosimilitud. Se utilizaron todas las especies de *Boana* para este análisis. Además, se usó el método de verosimilitud condicional como una corrección del sesgo de adquisición para tratar solo con sitios variables [47].

RESULTADOS

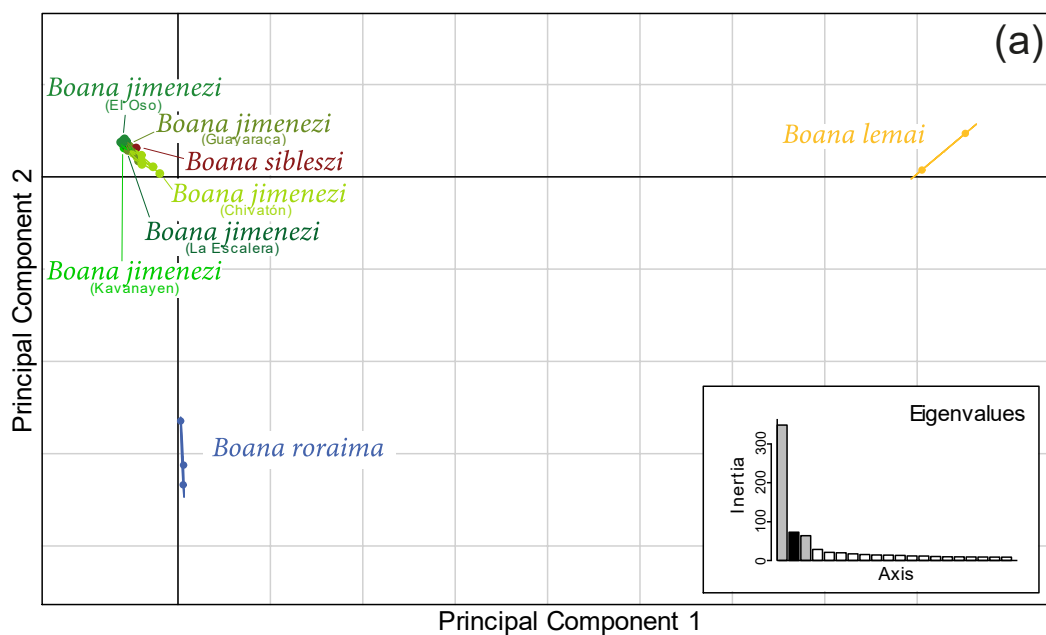
Análisis de Componentes Principales (PCA) entre las *Boana* spp. de la Gran Sabana

El análisis de componentes principales de 41 ranas del género *Boana* (*B. jimenezi* = 35, *B. roraima* = 3, *B. lemai* = 2 y *B. sibleszi* = 1) en siete distintas localidades presentó tres conglomerados genéticos (Figura No.2a). Las especies con correlaciones elevadas se agrupan en el PC1 (Componente Principal 1) formando el primer conglomerado, el

segundo y tercer conglomerado conformaron *Boana roraima* y *Boana lemai*. Los valores propios (eigenvalues) del análisis fueron: 354.7, 74.02, 64.96, 28.93 y 21.25 los cuales indican la cantidad de varianza representada por cada componente principal (PC).

Análisis de Componentes Principales (PCA) de *Boana jimenezi* en un gradiente altitudinal

El análisis de componentes principales para 35 individuos de la especie *Boana jimenezi* en cinco sitios distintos (Kavanayen = 9, La Escalera = 2, Chivatón = 10, Guayaraca = 5 y El Oso = 9) sugirió la presencia de dos conglomerados principales (Figura No.2b). Las muestras de las poblaciones de Kavanayén, La Escalera, Guayaraca y Chivatón integran el primer conglomerado mientras que únicamente la población de El Oso, de la cima del Auyantepui, forma el segundo conglomerado. Los valores que indican la proporción de variabilidad genómica de acuerdo a cada componente principal (PC) fueron: 30.22, 21.25, 18.67, 16.1 y 15.34.



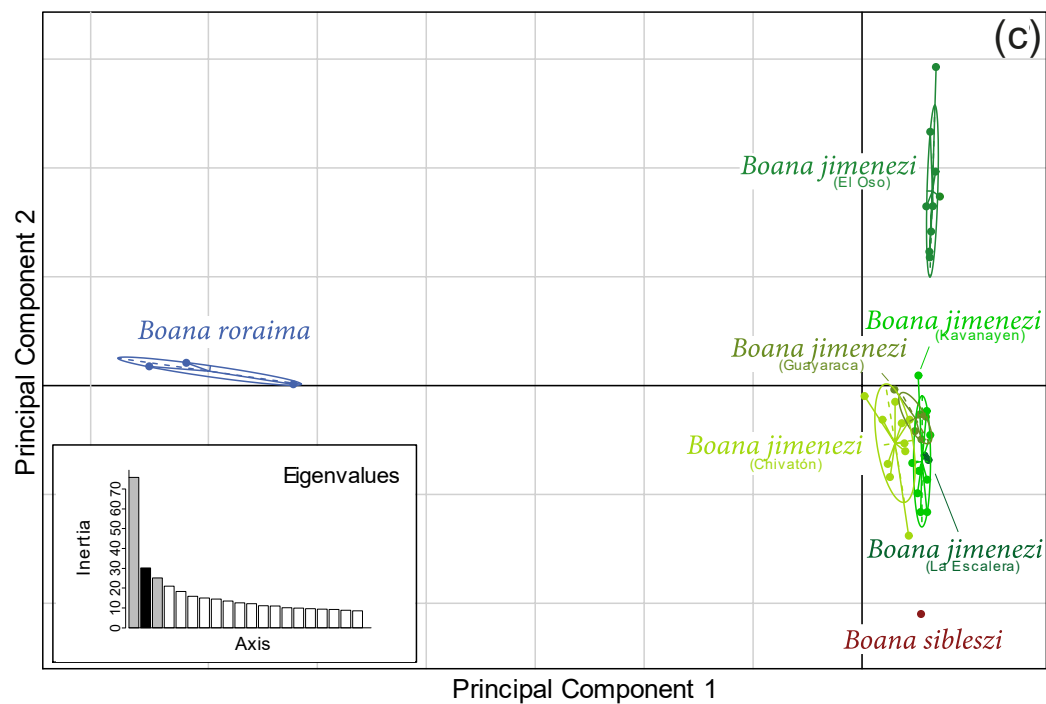
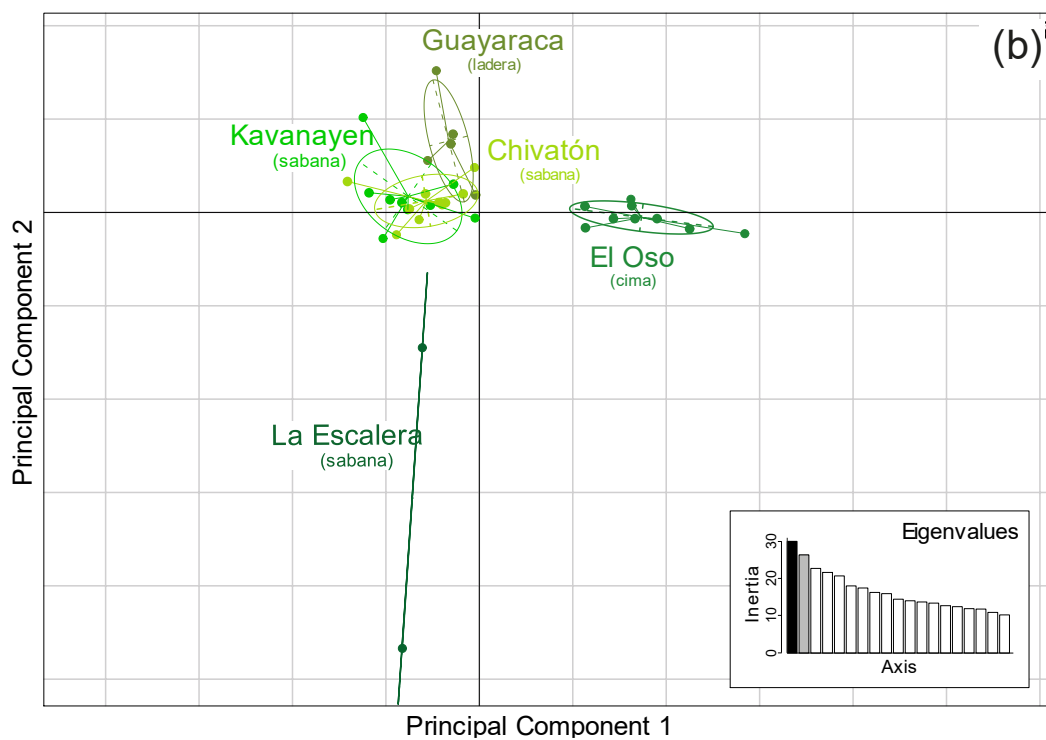


Figura No.2: Estructura de la población a partir del PCA.
Realizado por: Gallo, 2022.

(a) 41 individuos de *Boana*, en esta figura los dos individuos de *B. lemai* fueron clasificados como la misma localidad, (b) 35 individuos de *Boana jimenezi*, (c) 39 individuos de *Boana* de la Gran Sabana, en esta figura los dos individuos de *Boana lemai* fueron eliminados. Los colores fueron asignados para cada población de la siguiente manera: la gama del color verde corresponde a la especie *B. jimenezi*, *B. lemai* está representada con el color amarillo, a *B. roraima* se le asignó el color azul y para *B. sibleszi* el color rojo vino.

Probabilidad de asignación grupal de individuos (compoplot) entre las *Boana* spp. de la Gran Sabana

El análisis de compoplot muestra los grupos de acuerdo a las especies de cada localidad y cada barra representa un individuo secuenciado dentro de la población. En este caso podemos ver que existen tres conglomerados (Figura No.3a) donde todas las poblaciones de *B. jimenezi* (Kavanayen, La Escalera, Guayaraca, El Oso, Chivatón) y *B. sibleszi* (Pacheco) integran un conglomerado que retiene un alto nivel de mezcla genética (admixture), la especie *B. lemai* formó el segundo y *B. roraima* el tercer conglomerado, estas dos últimas son las únicas poblaciones que se encuentran bien definidas. Los colores en las 41 barras representan la proporción genética de la población dentro de cada individuo, lo que significa que mientras mayor combinación de colores exista, se tiene mayor mezcla genética.

En los dos análisis de compoplot con *B. lemai* (Figura No.3a) y sin *B. lemai* (Figura No.3c) podemos observar cómo la inclusión y exclusión de *Boana lemai* (especie con alta divergencia) puede alterar drásticamente las inferencias de estructura poblacional. En el primer gráfico de compoplot (Figura No.3a) la influencia de la especie divergente (*Boana lemai*) es muy notoria, puesto que, todas las poblaciones de *Boana jimenezi* (Kavanayen, La Escalera, Guayaraca, El Oso, Chivatón) y *B. sibleszi* presentan admixture; sin embargo, *Boana lemai* y *Boana roraima* fueron las especies quienes retuvieron el 100% de identidad genética propia en cada una de las barras.

En cambio, en el análisis donde se excluyó a la especie divergente (Figura No.2c, 3c, 4c) se aprecia en ciertas poblaciones una ligera ausencia de mezcla genética y el nivel de admixture no es tan elevado a comparación del análisis con *B. lemai* presente (Figura No.2a, 3a y 4a) por otro lado, *Boana roraima* conserva el 100% de rasgos propios al igual que *Boana jimenezi* de la cima del Auyantepui, localidad El Oso y *Boana sibleszi*. Es importante mencionar que el resultado de la especie *B. sibleszi* fluctuó en los dos análisis, en el primero apenas conservó un 20% de rasgos genéticos propios, pero en el último análisis, *B. lemai* ausente (Figura No.2c, 3c y 4c) su porcentaje incrementó al 100%.

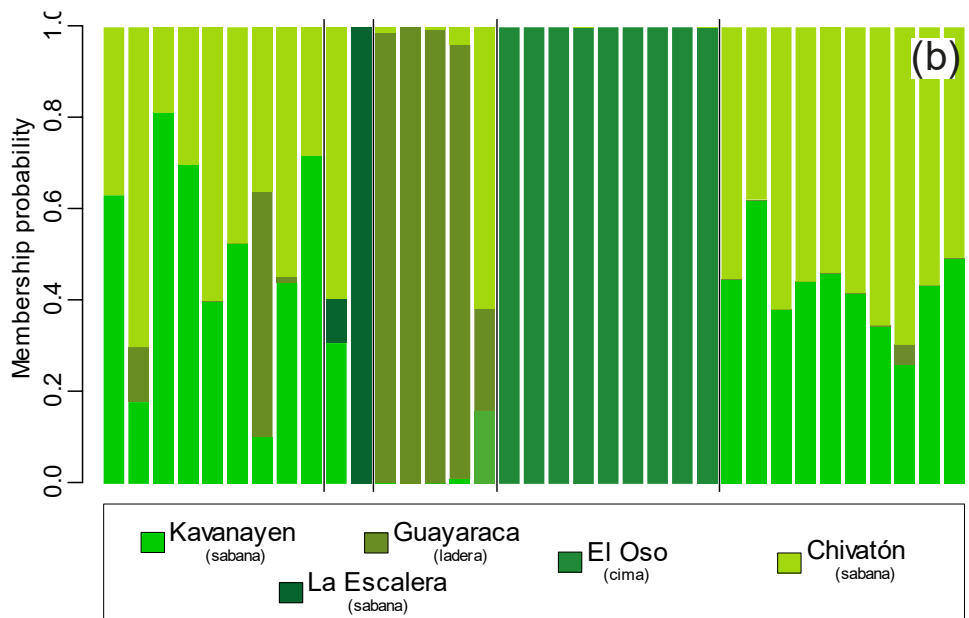
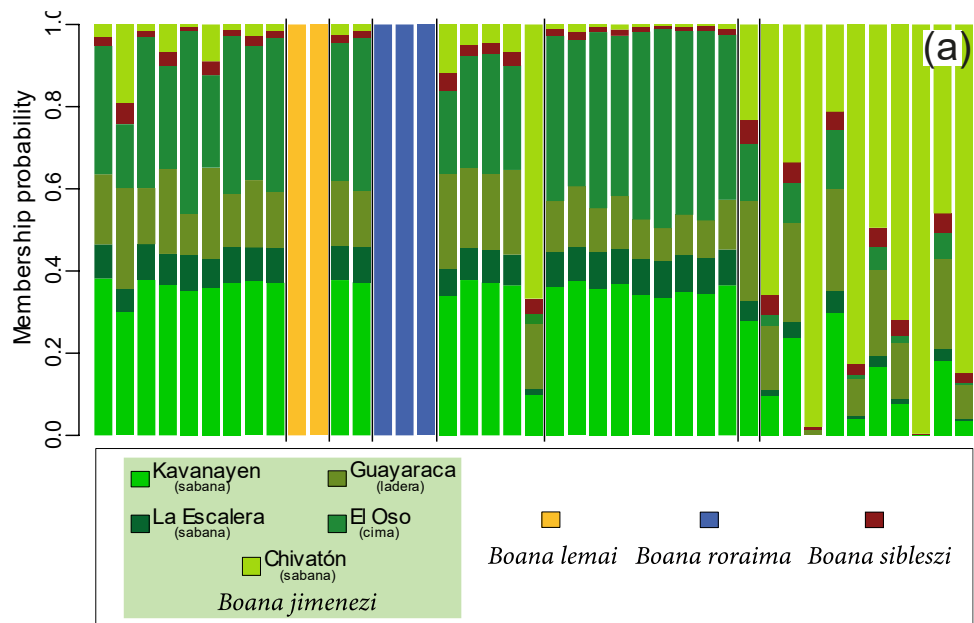
Probabilidad de asignación grupal de individuos (compoplot) de la especie *Boana jimenezi* en un gradiente altitudinal

Los resultados del compoplot proponen dos conglomerados (Figura No.3b) donde se muestran a los 35 individuos de *Boana jimenezi* representados en cada barra y ordenados de acuerdo a cada localidad. Las poblaciones de la sabana (Kavanayen, La Escalera, y Chivatón) y de la ladera (Guayaraca) componen el primer conglomerado con una ligera mezcla genética (admixture), mientras que la población de la cima del Auyantepui (El Oso) formó el segundo conglomerado sin admixture. Los colores en las barras simbolizan el porcentaje de rasgos genéticos de cada población dentro del individuo.

Los ocho individuos de la población Kavanayen (sabana) comparten rasgos con otra población de la sabana (Chivatón) y un ligero porcentaje genético de la población de la ladera (Guayaraca); sin embargo, un individuo posee un porcentaje mayor a 50 de características genéticas de la población Guayaraca y conserva apenas un 10% de rasgos propios de la población Kavanayen. En cambio, un individuo de la población Chivatón contiene rasgos de dos poblaciones de la sabana (Chivatón y Kavanayen) y un ínfimo porcentaje (4%) de la población de la ladera (Guayaraca), mientras que los nueve restantes resultan una mezcla entre Chivatón y Kavanayen.

La única población que tuvo 100% de identidad genética, sin inferencia de mezcla, es El Oso (cima del Auyantepui). Si bien un individuo de la población La Escalera también conservó los rasgos propios en su totalidad, el otro individuo restante fue mezcla de tres localidades de la sabana (Kavanayen, Chivatón y La Escalera).

Finalmente, cuatro individuos de la población Guayaraca mantienen más del 95% de identidad genética propia y el restante resulta una mezcla entre las poblaciones de la sabana (Kavanayen y Chivatón) y de la ladera (Guayaraca).



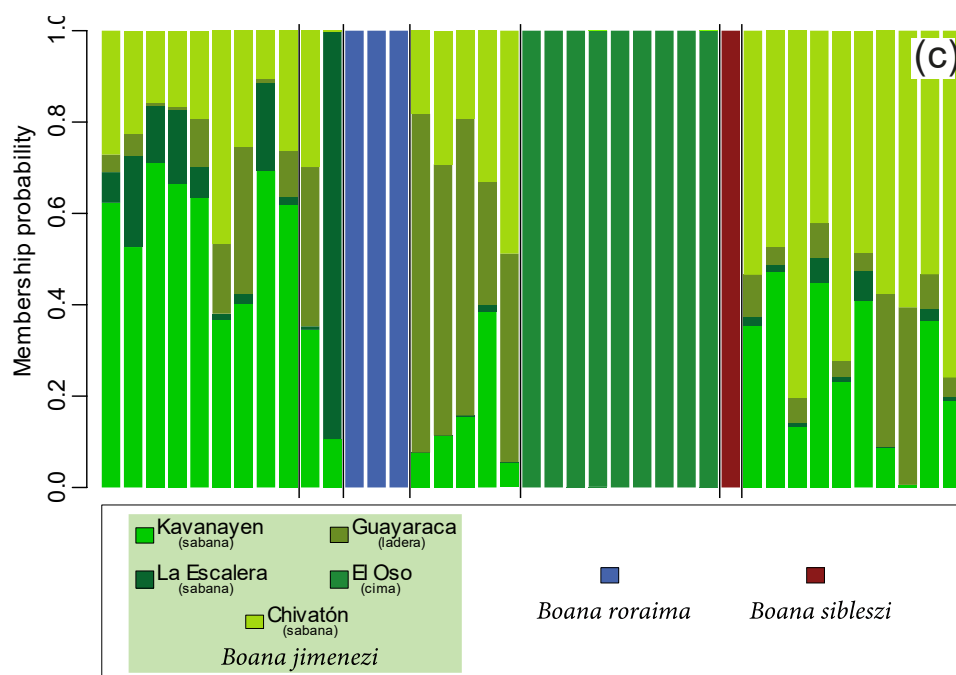


Figura No.3: Estructura de la población a partir del compoplot.
Realizado por: Gallo, 2022.

Las poblaciones se encuentran separadas unas de otras por una raya vertical de color negro y cada barra representa un individuo. (a) 41 individuos de *Boana*, en esta figura los dos individuos de *B. lemai* fueron clasificados como la misma localidad, (b) 35 individuos de *Boana jimenezi*, (c) 39 individuos de *Boana* de la Gran Sabana, en esta figura los dos individuos de *Boana lemai* fueron eliminados. Los colores fueron asignados para cada población de la siguiente manera: la gama del color verde corresponde a la especie *B. jimenezi*, *B. lemai* está representada con el color amarillo, a *B. roraima* se le asignó el color azul y para *B. sibleszi* el color rojo vino.

Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) entre las *Boana* spp. de la Gran Sabana

El resultado para el análisis discriminante de componentes principales usando los 41 individuos de las cuatro especies (*B. jimenezi*, *B. roraima*, *B. lemai* y *B. sibleszi*) en las siete localidades sugirió tres conglomerados genéticos (Figura No.4a). En el primer análisis (Figura No.2a, 3a, 4a) los ejemplares de *B. lemai* fueron clasificados como la misma localidad y al igual que la gráfica anterior (Figura No.2a), los individuos que se encontraban agrupados conforman el primer conglomerado genético, el segundo conglomerado está conformado por *Boana lemai* y el tercero por *Boana roraima*.

Boana lemai resultó ser una especie muy divergente la cual alteró los resultados del análisis discriminante entre la Figura No.4a y 4c. Con este antecedente y para observar las variaciones generadas por *Boana lemai* se realizó un nuevo análisis descartando a

la especie divergente, el resultado mostró dos conglomerados principales (Figura No.4c), el primero integró *Boana roraima* de la localidad Salto Ángel y el segundo conglomerado con *B. sibleszi* de la localidad Pacheco y las cinco localidades de *B. jimenezi* (Kavanayen, La Escalera, Chivatón, Guayaraca y El Oso); además, las poblaciones que se encontraban agrupadas unas sobre otras se dispersaron al tiempo que otras aglomeraciones delimitadas por elipses se ampliaron. Los valores propios del análisis discriminante fueron: 3876 y 373.6.

Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de *Boana jimenezi* en un gradiente altitudinal

El análisis discriminante de componentes principales de 35 individuos en cinco localidades mostró dos grupos genéticos ($K = 2$) (Figura No.4b). Como se observa en la figura del DAPC (Figura No.4b), el primer componente principal, el cual representa el 57.91% de la variación, puede discriminar entre las poblaciones de Kavanayen, Guayaraca y Chivatón (se agrupan en el PC1) y la población de la cima del Auyantepui (El Oso).

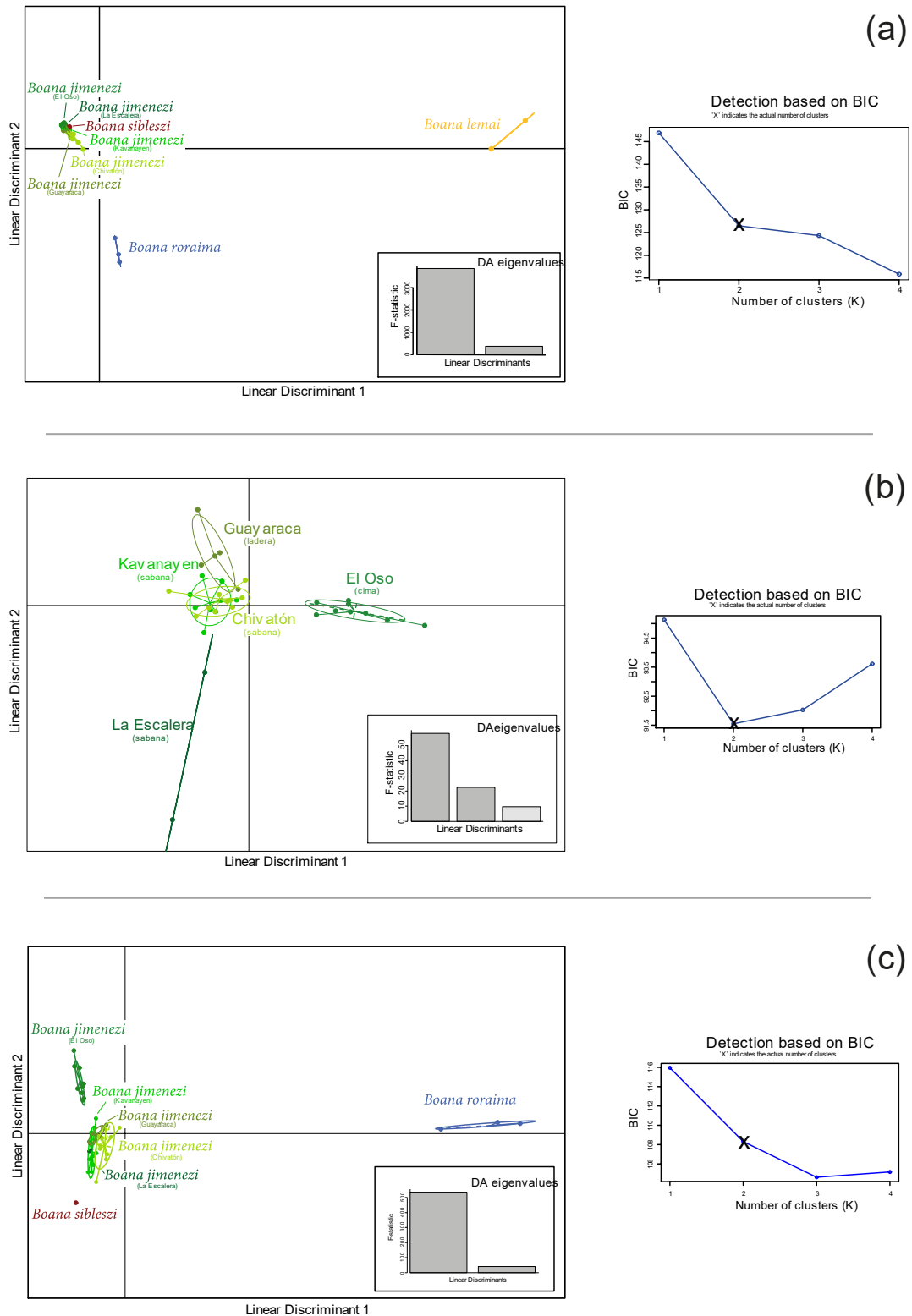


Figura No.4: Estructura de la población a partir del DAPC (lado izquierdo) y BIC (lado derecho).

Realizado por: Gallo, 2022.

(a) 41 individuos de *Boana*, en esta figura los dos individuos de *B. lemai* fueron clasificados como la misma localidad, (b) 35 individuos de *Boana jimenezzi*, (c) 39 individuos de *Boana* de la Gran Sabana, en esta figura los dos individuos de *Boana lemai* fueron eliminados. Los colores fueron asignados para cada población de la siguiente manera: la gama del

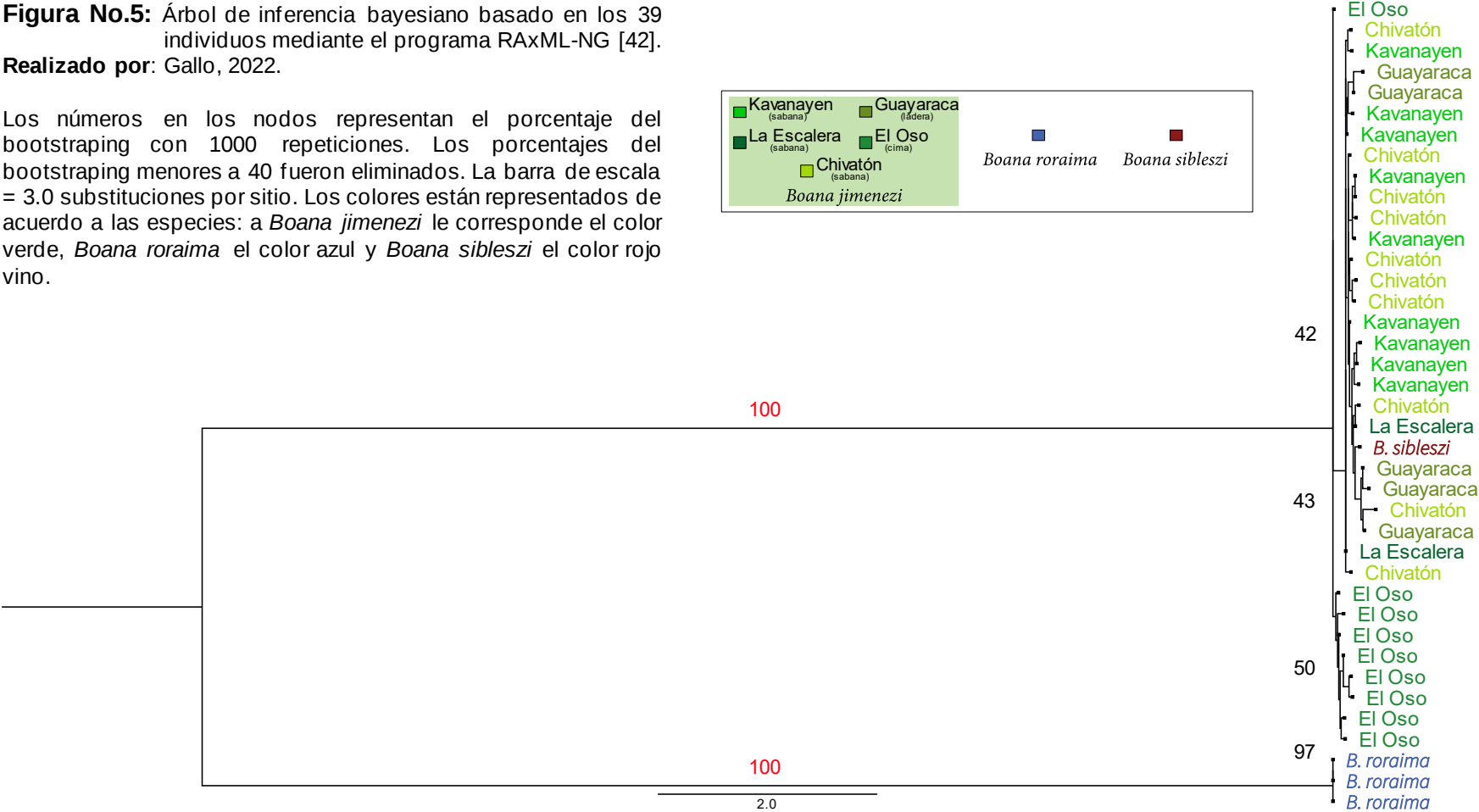
color verde corresponde a la especie *B. jimenezi*, *B. lemai* está representada con el color amarillo, a *B. roraima* se le asignó el color azul y para *B. sibleszi* el color rojo vino.

Historia filogeográfica

La inferencia filogenética basada en los 39 individuos (excluyendo los dos individuos de *B. lemai*) de las tres especies (*B. jimenezi*, *B. roraima* y *B. sibleszi*) mostró a la población de *B. roraima* de Salto Ángel como grupo externo y altamente divergente. Los nueve individuos de *B. jimenezi* de la localidad El Oso (cima del Auyantepui) revelaron poca divergencia en comparación con la ladera y la sabana en la filogenia. A pesar de la baja divergencia de la población de la cima (El Oso) con las demás, se aprecia que es la única población que se reconstruye como monofilética (con la excepción de un solo individuo) aunque con bajo soporte (bootstrap = 50%).

Figura No.5: Árbol de inferencia bayesiano basado en los 39 individuos mediante el programa RAxML-NG [42].
Realizado por: Gallo, 2022.

Los números en los nodos representan el porcentaje del bootstraping con 1000 repeticiones. Los porcentajes del bootstraping menores a 40 fueron eliminados. La barra de escala = 3.0 substituciones por sitio. Los colores están representados de acuerdo a las especies: a *Boana jimenezi* le corresponde el color verde, *Boana roraima* el color azul y *Boana sibleszi* el color rojo vino.



Índice de fijación por pares (pairwise F_{st}) entre las *Boana* spp. de la Gran Sabana

Se estimó la diferenciación genética entre poblaciones de las cuatro especies de *Boana* en siete lugares de muestreo: *B. roraima* de la localidad Salto Ángel (N = 3), *B. lemai* de la localidad Kavanayen (N = 1) y La Escalera (N = 1), *B. sibleszi* de la localidad Pacheco (N = 1) y *B. jimenezi* de las localidades de Chivatón (N = 10), La Escalera (N = 2), Kavanayen (N = 9), Guayaraca (N = 5) y El Oso (N = 9) (Tabla No.1).

Los pares de poblaciones con más divergencia (muchoa variabilidad y diferencia entre grupos) fueron entre *Boana jimenezi* de la localidad El Oso (cima del Auyantepui) con *Boana lemai* de ambas poblaciones: Kavanayen (sabana) que tuvo un valor de 0.921 y La Escalera (sabana) con 0.916. Por el contrario, el par de poblaciones con el valor más bajo, es decir, que tiene la divergencia menor, fueron *Boana jimenezi* de la localidad Kavanayen (sabana) y *Boana jimenezi* de Chivatón (sabana) con 0.013.

Las siglas NaN (Not a Number) indican que no existen datos suficientes para generar una comparación, esto ocurre cuando el resultado es imposible de calcular y los SNPs que se genotipificaron resultaron con muy poco aglomeramiento, como es el caso de *Boana lemai* de localidad Kavanayen (sabana) con La Escalera (sabana), y *Boana sibleszi* de Pacheco (sabana) con *Boana lemai* de ambas localidades (Kavanayen y La Escalera).

Tabla No.1: Índice de fijación por pares (pairwise F_{st}) (Nei, 1987) entre las *Boana* spp. de seis localidades de la sabana, dos de la ladera y una de la cima del Auyantepui.

	<i>B. roraima</i>	<i>B. lemai</i>		<i>B. sibleszi</i>	<i>B. jimenezi</i>			
	Salto Ángel (ladera)	Kavanayen (sabana)	La Escalera (sabana)	Pacheco (sabana)	Chivatón (sabana)	La Escalera (sabana)	Kavanayen (sabana)	Guayaraca (ladera)
<i>B. roraima</i> Salto Ángel (ladera)		-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lemai</i> Kavanayen (sabana)	0.905		-	-	-	-	-	-
<i>B. lemai</i> La Escalera (sabana)	0.887	NaN		-	-	-	-	-
<i>B. sibleszi</i> Pacheco (sabana)	0.888	NaN	NaN		-	-	-	-
<i>B. jimenezi</i> Chivatón (sabana)	0.883	0.904	0.900	0.142		-	-	-
<i>B. jimenezi</i> La Escalera (sabana)	0.903	0.913	0.909	0.213	0.059		-	-
<i>B. jimenezi</i> Kavanayen (sabana)	0.879	0.903	0.899	0.163	0.013	0.062		-
<i>B. jimenezi</i> Guayaraca (ladera)	0.877	0.910	0.906	0.193	0.110	0.182	0.121	
<i>B. jimenezi</i> El Oso (cima)	0.879	0.921	0.916	0.345	0.253	0.287	0.240	0.245

Realizado por: Gallo, 2022.

Diversidad genómica y endogamia entre poblaciones de *Boana jimenezi*

La diversidad genética de *Boana jimenezi* fue variable entre las poblaciones. Luego de suprimir la población de La Escalera (sabana) a causa de la insuficiente cantidad de individuos ($N = 2$), se retuvo 33 individuos de cuatro localidades (Kavanayen = 9, Guayaraca = 5, El Oso = 9, y Chivatón = 10) para este análisis.

En la Tabla No.2 se logra inferir que entre los valores menores de heterocigosidad observada (H_o) está Chivatón (sabana) (0.035), seguido por la localidad El Oso (cima) (0.036) y al fijarnos en el coeficiente de consanguineidad (F_{is}) - el cual es bastante sensible cuando hay mucha estructura poblacional [48] - de la población Chivatón es el más elevado (0.248) de todas las poblaciones.

Tabla No.2: Diversidad genética de *B. jimenezi*. Los 33 individuos pertenecen a cuatro localidades.

	H_o	H_e	F_{is}
Kavanayen (N = 9) (sabana)	0.049	0.052	0.046
Chivatón (N = 10) (sabana)	0.035	0.046	0.248
Guayaraca (N = 5) (ladera)	0.040	0.045	0.128
El Oso (N = 9) (cima)	0.036	0.041	0.110

Realizado por: Gallo, 2022.

Coancestría individual

Para este análisis se usó los datos de los 35 individuos de la especie *Boana jimenezi* en cinco localidades (Kavanayen = 9, La Escalera = 2, Guayaraca = 5, El Oso = 9, y Chivatón = 10). La localidad El Oso (cima) tuvo alto grado de coancestría, sugiriendo mayores niveles de endogamia de esta población en comparación con las demás; mientras que, la población de Kavanayen (sabana) tiene escasos niveles de endogamia.

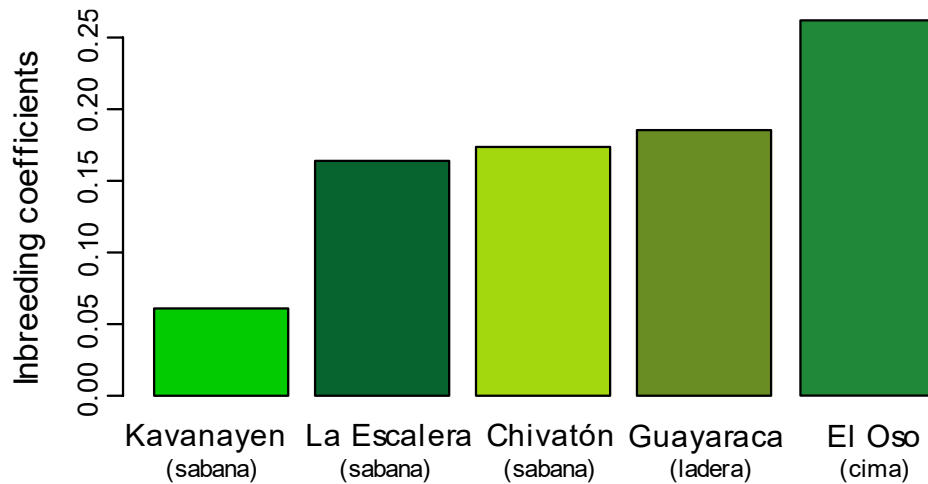


Figura No.6: Coancestría genómica de las poblaciones de *Boana jimenezi* en cinco localidades de la Gran Sabana venezolana.
Realizado por: Gallo, 2022.

DISCUSIÓN

Aislamiento de una población de *Boana jimenezi* (localidad de la cima)

La región geológica del Escudo Guayanés forma parte del Cratón Amazónico [49], una masa continental que sufrió un plegamiento [50] y una subducción oceánica de corteza Atlántica [51] que se hunde 500 km de profundidad hacia el oeste por debajo de la placa oceánica Caribe [52]. En consecuencia, del movimiento tectónico se forma la región discontinua del Pantepui [53], un conjunto de montañas catalogado como provincia biogeográfica debido a la presencia de 50 islas topográficas denominadas tepuis [54].

El relieve extremadamente quebrado e irregular de los tepuis [49,55], lugar que alberga un alto nivel de endemismos, limita las búsquedas [17]; a pesar de estas complejas condiciones geográficas, las exploraciones han sido un éxito, favoreciendo al hallazgo de nuevas especies de anfibios en las tierras altas (cima) [56–61].

Las distribuciones geográficas de varias especies han sido escasamente estudiadas [62–64]. Aunque la mayoría de géneros se encuentran restringidos por las condiciones geográficas, pocas de las especies reportadas en los tepuis poseen un rango de distribución altitudinal muy amplio [65], una de ellas siendo *Boana jimenezi* [17].

A manera de hipótesis se ha dicho que existió una diversificación reciente [66] luego de que las cumbres fueran colonizadas por especies de tierras bajas (sabana), mediante diversos mecanismos como cambios de hábitat, desplazamiento vertical (clima frío) y salto de cima en cima (island hopping) [9,67,68]. Se conoce, que la divergencia existente no es significativa debido a que la cima de los tepuis son de origen precámbrico y los linajes presentes en las cumbres son considerados endémicos y antiguos [8,9,13,25,69,70].

En general, se han encontrado diversas teorías y enunciados acerca del origen de la diversidad de esta provincia biogeográfica, algunos proponen que la diversidad es producto de distintos procesos ecológicos y/o evolutivos a causa de cambios climáticos del Cuaternario en la configuración de las comunidades ecológicas actuales [14,71]. Asimismo, plantean que fue resultado de la vicarianza por una antigua fragmentación de la meseta [66,69], otros expertos, consideran una consecuencia de la mezcla entre la compleja historia geológica y un patrón de paisaje pedológico-geomorfológico bien marcado en todos los niveles altitudinales [10].

Gran parte de las especies de la cima son endémicas divergentes con excepciones, estas especies también llamadas neoendémicas, son taxones endémicos de origen autóctono relativamente reciente [66]. En nuestro estudio encontramos que existe un aislamiento de la población de la cima (El Oso), de tal modo que se evidencia poco o ningún flujo genético actual entre la cima y las tierras bajas en distintos análisis (Figura No.2b, 3b, 4b). No obstante, al revisar la filogenia (Figura No.5) y los análisis que incluyen las otras especies (Figura No.2c, 3c, 4c), la población de la cima (El Oso), a pesar de formar un clado con todos menos un individuo no tiene mucha divergencia genómica, por lo que evidentemente se trata de la misma especie; sugiriendo que no existe una divergencia histórica, sino una divergencia, probablemente colonización de la cima, relativamente reciente. A pesar de que la población se encuentra aislada a nivel actual, el nivel de aislamiento no es suficiente como para considerarse como una especie distinta.

La población de la cima (El Oso) a razón de encontrarse alejado de las otras poblaciones (Figura No.2b, 3b), es probable que presente un efecto fundador [72] debido a que pocos individuos de la especie *B. jimenezi* colonizaron la cima; esto se apoya con el índice de coancestría genómica (Figura No.6) el cual resultó alto para la población El Oso (cima) en comparación con las otras poblaciones, con un valor que supera el 0.25.

Identidad taxonómica de *Boana sibleszi*

La muestra del individuo que pertenecía a la población Pacheco (sabana), localidad ubicada en el sector oriental del Parque Nacional Canaima y se encontraba alejado de todas las poblaciones (en términos geográficos) (ANEXO A), resultó ser miembro de la especie *B. jimenezi* y no del grupo de *Boana sibleszi* como se pensaba inicialmente, debido a que en la filogenia (Figura No.5) se observa que el individuo permanece dentro de un clado compuesto por poblaciones de la especie *B. jimenezi* (Chivatón, La Escalera, Kavanayen y Guayaraca); por otro lado, en el análisis de compoplot donde se excluyó a *Boana lemai* (Figura No.3c) observamos como el individuo de *B. sibleszi* conservó el 100% de identidad genética propia de la población al igual que *B. jimenezi* de la localidad de la cima (El Oso).

De acuerdo a la literatura, *B. jimenezi* y *B. sibleszi* se encuentran estrechamente relacionadas e incluso los ejemplares de ambas especies han sido confundidos en diversas ocasiones [73] a causa de su distribución, vocalización y gran parecido osteológico [14,74]; por ello, lo más probable es que el individuo catalogado como *B. sibleszi* fue un individuo de *B. jimenezi* el cual fue identificado de manera errónea durante el muestreo. A pesar de compartir mismos hábitats, la distribución de *B. sibleszi* está restringida a las tierras altas [12] pero también se ha encontrado en lugares aledaños al oeste de Guyana [17].

El índice de fijación no proporcionó información relevante debido a que los SNPs que se genotipificaron resultaron con muy poco agrupamiento. En la inferencia obtenida a partir del PCA, DAPC y compoplot con la especie *B. lemai* ausente y presente en el análisis, se observó que la especie *B. sibleszi* parece no ser una especie distinta, sino una población divergente/admixta de *B. jimenezi* (Figura No.2a, 3a) con alguna variabilidad en ciertos patrones ya sea evolutivo o ecológico, o simplemente que se trate de algún morfotipo distinto [75–77]. Los rasgos entre poblaciones de la misma especie frecuentemente muestran variaciones y tal variación está vinculada a las diferencias de las variables ambientales [78,79] e incluso se ha encontrado diferencias ecológicas importantes entre las especies de anuros que coexisten [80].

De acuerdo a estudios relacionados a anuros, se han encontrado varias especies crípticas en el neotrópico [81,82] por lo que al individuo de *Boana sibleszi* se la podría estar considerando como una especie críptica [83] porque no está totalmente definida,

ni detallada; asimismo, algunos estudios mencionan que existe un alto número de especies crípticas que han sido omitidas en revisiones previas basadas en caracteres morfológicos [81,84], además un análisis basado en datos genéticos, morfológicos y bioacústicos presentó diversas especies crípticas no descritas donde se incluye al género *Hypsiboas* [82].

Los datos presentados en este estudio tuvieron ciertas limitaciones debido a que no estuvo enfocado en la taxonomía morfológica de las especies mencionadas por lo que no se puede llegar a una conclusión acerca de su taxonomía. No obstante, para un nuevo estudio se amerita una mayor investigación considerando caracteres potencialmente informativos como vocalizaciones, cariotipos y morfometría [85].

Se sugiere incluir también el modo reproductivo [86] y a su vez, utilizar un alto número de muestras de *Boana jimenezi* y *Boana sibleszi* no solo para entender las relaciones genéticas dentro de una misma especie y entre especies cercanamente emparentadas, sino también para confirmar si las muestras corresponden a dos especies distintas o si presentan algún patrón interesante evolutivo o ecológico entre ellas. Pese a que se desconoce la cuestión, el individuo de *B. sibleszi* podría ser un caso de diversidad críptica, especie genéticamente diferente pero muy difícil de distinguir morfológicamente [87]; morfotipo, subespecie conespecífica [88]; hibridación, cruce entre individuos de dos poblaciones o grupos de poblaciones diferenciados entre sí en uno o más caracteres heredables [89]; o alguna dinámica eco evolutiva que no se comprende todavía.

Divergencia en *Boana lemai*

Boana lemai podría tratarse de un caso de especie neoendémica [66], debido a que *B. lemai* junto a otras especies de su género (*B. sibleszi* y *B. roraima*), son considerados anfibios endémicos de la Guayana venezolana [90].

De acuerdo a la literatura *B. lemai* ha sido reportada en la cima del Monte Roraima a 1300-1400 m [91], lo que explica por qué resultó divergente respecto a las tres especies (*B. jimenezi*, *B. roraima* y *B. sibleszi*). Al fijarnos en los análisis de PCA y DAPC (Figura No.2a, 4a) de la especie *B. lemai*, a pesar de no compartir SNPs entre ellos, vemos que los análisis no están tratando de separar a los individuos, al contrario, toda la variabilidad que está presente en los otros individuos hace que ambas localidades de *B. lemai* (Kavanayen y La Escalera) caigan en el mismo espacio de variabilidad de SNPs. En ese

motivo, tenemos seguridad de que, a pesar de compartir pocos datos (N=2), sí se trata de la misma especie.

No se pudo profundizar los resultados de los análisis respecto a otros. Algunos autores, coinciden en la poca o nula presencia de datos de *B. lemai* en la literatura. La mayoría de estudios en los que se emplean muestras del género *Boana* están poco respaldados o existe escasez de evidencia para comparar [18,92]. Los datos de *B. lemai*, efecto del escaso número de muestras (N=2), generaban mayor inferencia de admixture, por lo que fueron considerados problemáticos, desde un inicio.

El problema principal de los datos de *B. lemai* fue que, entre los dos individuos secuenciados no había datos que solapar, es decir, no existe un número suficiente para generar una comparación; por lo que no se consiguió resultados concretos [93].

El índice de fijación por pares respecto a *B. lemai*, no aportó mayor información, porque los SNPs encontrados entre los dos individuos no se agrupaban en su totalidad; lo que provocó ruido en el análisis de inferencia respecto a otras especies, razón por la que a *B. lemai* se la excluyó de los análisis de PCA, DAPC, compoplot y filogenia.

Diversidad genómica y potencial adaptativo

Sabemos que la diversidad genética, componente más básico de la biodiversidad [94], favorece a la adaptación de las especies y la función del ecosistema [95]. En este estudio al igual que Kok PJR et al. [96], se observa una menor diversidad genómica en los tepuis (Tabla 2); la población de la cima del Auyantepui (El Oso), posee un alto valor de coancestría (Figura No.6), por lo que se entiende que esta población tiene menor capacidad para desarrollar cambios genéticos en respuesta a la selección [97], pero sin diferencia a comparación de las poblaciones de tierras bajas (sabana).

La población de la cima (El Oso) puede que esté destinada a la extinción por su ubicación y aislamiento (Figura No.2b, 3b), sin embargo, se ha visto un intercambio reciente de fauna entre las cumbres de los tepuis que ha afectado positivamente a varios taxones, reduciendo la probabilidad de especiación [96], lo que podría ser indicativo de que esta especie pudiese incrementar el flujo genético entre la cima y las zonas medias y bajas.

La heterocigosidad inferida (Tabla 2) de la población de la cima (El Oso) resulta baja y con valores similares en comparación con las tierras medias y bajas; por lo que, a pesar de la alta divergencia y grado de aislamiento de la población El Oso, el resultado puede que persista. La única excepción es la población de la sabana (Chivatón) que tiene un valor muy bajo de diversidad genómica de 0.035, probablemente debido a la presencia de una subestructura genética, la cual es conocida como el efecto Wahlund y tiende a generar una falsa inferencia de endogamia [98,99].

Aun cuando los niveles de coancestría (indicador de endogamia) resultan altos para la población de la cima (Figura No.6), se intuye que esta población (El Oso), de acuerdo a los análisis sobre diversidad genética (Tabla 2), tienen altas posibilidades de subsistir, a pesar de estar totalmente aislados. Sabiendo que la endogamia puede alterar la diversidad genética como la pérdida de aptitud biológica o fitness [100], es necesario realizar más estudios, para entender el rol de esta especie en su ecosistema y así lograremos conocer la importancia en sus hábitats.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Gracias al uso de marcadores moleculares como el polimorfismo de nucleótido único (SNP) es posible obtener una gran cantidad de información genética de ciertas poblaciones a partir de análisis y estimación de parámetros como los niveles de heterocigosidad, endogamia, filogenia, etc. De acuerdo a lo mencionado, en nuestro estudio se pudo inferir que la especie *B. jimenezi* de la población de la cima (El Oso) no es una especie distinta a *B. jimenezi* por lo que la divergencia existente no es histórica sino una divergencia reciente.

Por otro lado, *Boana jimenezi* de la localidad El Oso (población de la cima) tiene heterocigosidad relativamente baja y poco o nada de flujo genético con las tierras medias y bajas, indicando que la subsistencia de esta población podría estar amenazada. El individuo de *B. sibleszi* podría tratarse de un caso de diversidad críptica, diversidad de morfotipos, hibridación o alguna dinámica eco-evolutiva que se desconoce debido a que nuestro estudio no estuvo enfocado en la taxonomía de las especies. Los datos de *B. lemai* eran escasos y debido al admixture generado, se tuvo que descartar

a la especie de varios análisis; a pesar de las limitaciones, se pudo comprobar que las muestras sí pertenecían a la misma especie.

El tamaño de muestras de *B. roraima*, *B. lemai* y *B. sibleszi* fue escaso respecto a la especie *Boana jimenezi*, lo que limitó a las inferencias filogenéticas y otros análisis; por lo que se recomienda que, para un próximo estudio, se incrementen los esfuerzos de muestreo de otras especies de *Boana*. en esta zona de estudio. Asimismo, se debe revisar a nivel taxonómico y morfológico los especímenes de holotipos y paratipos de *Boana sibleszi* y *Boana jimenezi* para conocer lo que ocurre con ambas especies, ya que nuestros datos sugieren que puede tratarse de la misma especie.

REFERENCIAS

1. Uribe E. El cambio climático y sus efectos en la biodiversidad en América Latina. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). 2015; 86. Available: <https://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/20.500.13082/29216>
2. Frits Hesselink, Wendy Goldstein, Mter Paul van Kempen TG y JD. La Comunicación, Educación, y Conciencia Pública. Una caja de herramientas para personas que coordinan las Estrategias Nacionales de Biodiversidad y los Planes de Acción. 2007.
3. McCarthy J, Canziani O, Leary N, Dokken D, White K. Climate Change 2001: Impacts, Adaptation, and Vulnerability: Contribution of ... - Intergovernmental Panel on Climate Change. Working Group II., Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, Intergovernmental Panel on Climate Change, Int. In: Intergovernmental panel on climate change [Internet]. 2001 [cited 18 Jul 2021] pp. 3–5. Available: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=RT7lQ24quc4C&oi=fnd&pg=PP9&dq=Climate+Change+2001:+Impacts,+Adaptation,+and+Vulnerability+McCarthy&ots=ouU8-ojmK1&sig=qNtwJ0q7lp7pFUfq_8jEzQfqQjY#v=onepage&q=Climate+Change+2001%3A+Impacts%2C+Adaptation%2C+an
4. Dirnböck T, Dullinger S, Grabherr G. A regional impact assessment of climate and land-use change on alpine vegetation. *J Biogeogr.* 2003;30: 401–417. doi:10.1046/J.1365-2699.2003.00839.X
5. Nardelli M, Túnez JI. Aportes de la genética de la conservación al estudio de los mamíferos neotropicales: revisión y análisis crítico. *Ecología Austral.* 2017;27: 421–436. doi:10.25260/ea.17.27.3.0.539
6. Agúndez D, Alba N, Alía R, González-Martínez SC, Soto A, de Viana Á, et al. Variabilidad genética y gestión forestal. *Ecosistemas.* 2003;12: 6. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012307>
7. Rull V, Vegas-Vilarrúbia T, Huber O, Señaris C. Biodiversity of pantepui : The pristine “lost world” of the neotropical guiana highlands. *Biodiversity of Pantepui: The Pristine “Lost World” of the Neotropical Guiana Highlands.* 2019. doi:10.1016/C2017-0-03247-0
8. Hoogmoed MS. The Herpetofauna of the Guianan Region. *The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal.* 1979; 241–279.
9. Huber O. Guayana Highlands versus Guayana Lowlands, a Reappraisal. *Taxon.* 1988;37: 595–614. doi:10.2307/1221102
10. Huber O. Recent advances in the phytogeography of the Guayana Region, South America. *Memoires de la Societe de Biogeographie.* 1994;3: 53–63. Available: <https://scholar.google.com/scholar?cluster=8429323901109539870&hl=en&oi=scholar>
11. Duellman WE. Distribution Patterens of Amphibians in South America. *Patterns of distribution of amphibians: a Global Perspective.* 1999;perspectiv: 255–328. Available: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=2WScSPkvY0AC&oi=fnd&pg=PA31&dq>

=Duellman,+W.+E.+1999.+Distribution+patterns+of+amphibians+in+South+America&ots=vYyuQKg8qj&sig=19ax0VO6nIY4rqF31xOuB4Ce2cg

12. Gorzula Stefan, Señaris JC. Contribution to the herpetofauna of the Venezuelan Guayana I. A data base. *Scientia Guaianae*. 1998;1: 1–269.
13. Mcdiarmid RW, Donnelly MA. The Herpetofauna of the Guayana Highlands : Amphibians and Reptiles of the Lost World. *Ecology and evolution in the tropics: a herpetological perspective*. 2005.
14. Señaris C, Rojas-Runjaic FJM. Amphibians and Reptiles of Venezuelan Guayana: Diversity, Biogeography and Conservation. *Neotropical Diversification: Patterns and Processes*. 2020. pp. 571–633. doi:10.1007/978-3-030-31167-4_22
15. Mittelbach GG, Schemske DW, Cornell H V., Allen AP, Brown JM, Bush MB, et al. Evolution and the latitudinal diversity gradient: Speciation, extinction and biogeography. *Ecology Letters*. John Wiley & Sons, Ltd; 2007. pp. 315–331. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01020.x
16. Aubrecht, Barrio-Amorós, Breure, Brewrer-Carías, Derka, Fuentes-Ramos, et al. Venezuelan Tepuis: their caves and biota. Bratislava, Eslovaquia: Acta Geologica Slovaca, AGEOS; 2012.
17. Señaris JC, Avarzagüena J. A new species of *Hypsiboas* (Amphibia; Anura; Hylidae) from the Venezuelan Guayana, with notes on *Hypsiboas sibleszi* (Rivero 1972). *Herpetologica*. 2009;62: 308–318. doi:10.1655/0018-0831(2006)62[308:ANSOHH]2.0.CO;2
18. Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist*. 2005; 1–227. doi:10.1206/0003-0090(2005)294[0001:srotff]2.0.co;2
19. Dubois A. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina*. 2017;11: 1–48. doi:10.11646/bionomina.11.1.1
20. Frost DR. Amphibian Species of the World: An Online Reference (Version 6) . Reference Reviews. 2015;28: 32–32. doi:10.1108/rr-05-2014-0125
21. Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X, Moen DS. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Mol Phylogenet Evol*. 2010;55: 871–882. doi:10.1016/j.ympev.2010.03.013
22. Godoy JA. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*. 2009;18: 23–33.
23. Ríos E, Mejía-Ruiz H, Álvarez-Castañeda ST. Marcadores moleculares: Una revolucion en la zoonología. *Ciencia*. 2009.

24. Leaché AD, Oaks JR. The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2017;48: 69–84. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110316-022645
25. Heinicke MP, Duellman WE, Trueb L, Means DB, Macculloch RD, Hedges SB. A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa.* 2009; 1–35. doi:10.11646/zootaxa.2211.1.1
26. QGIS Development Team. QGIS. 2019.
27. Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE. Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One.* 2012;7: e37135. doi:10.1371/journal.pone.0037135
28. Illumina Inc. Technical note: quality scores for next-generation sequencing. 2000.
29. Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, Amores A, Cresko WA. Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol.* 2013;22: 3124–3140. doi:10.1111/mec.12354
30. GitHub Inc. Atom. 2017.
31. Sumangali K, Borra L, Suraj Mishra A. A Comprehensive review on the open source hackable text editor-ATOM. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* IOP Publishing; 2017. p. 042061. doi:10.1088/1757-899X/263/4/042061
32. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017.
33. Ihaka R, Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics.* 1996;5: 299–314. doi:10.1080/10618600.1996.10474713
34. Jombart T. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.* 2008;24: 1403–1405. doi:10.1093/bioinformatics/btn129
35. Jombart T, Ahmed I. Adegnet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics.* 2011;27: 3070–3071. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTR521
36. Almenara Barrios J, González Caballero JL, García Ortega C, Peña González P. ¿Qué es el análisis de componentes principales? *Jano.* 1998 [cited 19 May 2022]. Available: <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295023555011.pdf>
37. Peña D. Análisis de Datos Multivariantes “Analysis of economic activity using economic indicators and assessment of public policies”. View project On time series clustering View project. 2002.
38. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 2010;11. doi:10.1186/1471-2156-11-94
39. Schwarz G. Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics.* 1978;6: 461–464. doi:10.2307/2958889

40. Zhao Q, Hautamaki V, Fränti P. Knee Point Detection in BIC for Detecting the Number of Clusters. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*. 2008;5259 LNCS: 664–673. doi:10.1007/978-3-540-88458-3_60
41. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14: 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
42. Grenander U, Duda RO, Hart PE. Pattern Classification and Scene Analysis. *J Am Stat Assoc*. 1974;69: 829. doi:10.2307/2286028
43. Bishop C. Neural networks for pattern recognition. Oxford university press. 1995 [cited 23 May 2022]. Available: https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=T0S0BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=neural+networks+for+pattern+recognition+bishop+1995&ots=jN7WuG6Dpk&sig=S18OFIH41_azspnRTRSFs31JxKQ
44. Jombart T. A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 1.3-4. 2012.
45. Goudet J, Jombart T. Hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. R Core Team. 2021. p. 58.
46. Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A. RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*. 2019;35: 4453–4455. doi:10.1093/bioinformatics/btz305
47. Lewis PO. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Syst Biol*. 2001;50: 913–925. doi:10.1080/106351501753462876
48. De Meeûs T. Revisiting FIS, FST, Wahlund Effects, and Null Alleles. *Journal of Heredity*. 2018;109: 446–456. doi:10.1093/jhered/esx106
49. Mendoza Vicente. Evolución Geotectónica y recursos minerales del Escudo de Guayana en Venezuela (y su relación con el Escudo Suramericano). 211 pgs. Universidad de Oriente. 2000; 211.
50. Acelolaza FG. Historia de la Geología Argentina. *Historia Santiago*. 2007; 20–22.
51. Molnar P, Sykes LR. Tectonics of the caribbean and middle america regions from focal mechanisms and seismicity. *Bulletin of the Geological Society of America*. 1969;80: 1639–1684. doi:10.1130/0016-7606(1969)80[1639:TOTCAM]2.0.CO;2
52. Giraldo C, Schmitz M. Un transecto La Blanquilla-cratón guayanés, Venezuela oriental: modelos corticales. *XI Congreso Venezolano de Geofísica*. Singer y Audemard; 2002.
53. Costa M, Vilorio ÁL, Huber O, Attal S, Orellana A. Lepidoptera del pantepui. Parte I: Endemismo y caracterización biogeográfica. *Entomotropica*. 2013;28: 193–217.

54. Désamoré A, Vanderpoorten A, Laenen B, Robbert Gradstein S, Kok PJR. Biogeography of the Lost World (Pantepui region, northeastern South America): Insights from bryophytes. *Phytotaxa*. 2010;9: 254–265. doi:10.11646/PHYTOTAXA.9.1.14
55. Blancanaeux P. Ensayo de geografía de suelos en el escudo guayanés. 1982.
56. Ayarzagüena J, Señaris JC. Dos nuevas especies de *Hyla* (Anura; Hylidae) para las Cumbres Tepuyanas del Estado Amazonas, Venezuela. *Memoria Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*. 1993;53: 127–146.
57. La Marca E. Ranas del genero *Colostethus* (Amphibia: Anura; Dendrobatidae) de la Guayana Venezolana con la descripcion de siete especies nuevas. *Publicaciones de la asociacion de amigos de Doñana*. 1996;9: 1–64.
58. Smith EN, Noonan BP. A new species of *Osteocephalus* (Anura: Hylidae) from Guyana. *Rev Biol Trop*. 2001;49: 347–357.
59. Myers CW, Donnelly MA. Herpetofauna of the Yutajé-Corocoro massif, venezuela: Second report from the Robert G. Goellet American Museum-terramar expedition to the Northwestern tepuis. *Bull Am Mus Nat Hist*. 2001; 3–85. doi:10.1206/0003-0090(2001)261<0001:hotycm>2.0.co;2
60. Señaris JC, Ayarzagüena J. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from the highlands of Venezuelan Guayana. *J Herpetol*. 2002;36: 634–640. doi:10.1670/0022-1511(2002)036[0634:ANSOHA]2.0.CO;2
61. Barrio-Amorós CL, Fuentes O. A new species of *Stefania* (Anura: Hylidae: Hemiphractinae) from the summit of Cerro Autana, Estado Amazonas, Venezuela. *Herpetologica*. 2003;59: 504–512. doi:10.1655/01-31
62. Silva e Silva YB, Costa-Campos CE. *Hyalinobatrachium iaspidiense* (Ayarzagüena, 1992) (Anura: Centrolenidae): First record in Amapá state, Brazil and geographic distribution map. *Check List*. 2016;12: 1–3. doi:10.15560/12.2.1849
63. Costa-Campos CE, Pinheiro RT, Castroviejo-Fisher S. Amphibia, anura, centrolenidae, *cochranelia resplendens* (Lynch & duellman, 1973): First record from Brazil and updated map of the geographic distribution. *Check List*. 2020;16: 847–851. doi:10.15560/16.4.847
64. Costa-Campos CE, de Figueiredo VAMB, Lima JRF, Lima JD. New record and distribution map of the glassfrog *Vitreorana ritae* (Lutz, 1952) (Anura: Centrolenidae) from Amapá state, Eastern Amazon. *Herpetology Notes*. 2020. pp. 733–737.
65. Barrio-Amorós CL, Castroviejo-Fisher S. Comments on the distribution, taxonomy and advertisement call of the Guyanan glass frog *Hyalinobatrachium ignicolus* (Anura: Centrolenidae) (*Salamandra* (2008) 44(4) 235-240). *Salamandra*. 2009. p. 64.
66. Salerno PE, Ron SR, Señaris JC, Rojas-Runjaic FJM, Noonan BP, Cannatella DC. Ancient tepui summits harbor young rather than old lineages of endemic frogs. *Evolution* (N Y). 2012;66: 3000–3013. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01666.x

67. Mayr E, Phelps WH. The Origin of the Bird Fauna of the South Venezuelan Highlands. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1967;136: 269–328.
68. Rull V. An evaluation of the Lost World and vertical displacement hypotheses in the Chimantá Massif, Venezuelan Guayana. *Global Ecology and Biogeography*. 2004;13: 141–148. doi:10.1111/j.1466-882X.2004.00073.x
69. Maguire B. On the Flora of the Guayana Highland. *Biotropica*. 1970;2: 85. doi:10.2307/2989766
70. Chapman FM. The upper zonal bird-life of Mts. Roraima and Duida. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1931;63: 1–42.
71. Valentí R, Carnaval AC. Neotropical Diversification: Patterns and Processes. Rull V, Carnaval AC, editors. Cham: Springer International Publishing; 2020. doi:10.1007/978-3-030-31167-4
72. Teplitz RR. An Introduction to Genetic Analysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1987;257: 2223. doi:10.1001/jama.1987.03390160109041
73. Mendoza RJS. Aportes para la identificación de las ranas gladiatoras del género *hypsiboas* (Wagler, 1830); (anura: hylidae), presentes en las tierras bajas del Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*. 2014;6: 55. doi:10.24188/recia.v6.n1.2014.203
74. Myers CW, Donnelly MA. The summit herpetofauna of Auyantepui, Venezuela: Report from the Robert G. Goellet American Museum-TERRAMAR expedition. *Bull Am Mus Nat Hist*. 2008; 1–147. doi:10.1206/308.1
75. Sagor' ES, Quellet M, Barten E, Green DM. Skeletochronology and geographic variation in age structure in the wood frog, *Rana sylvatica*. *J Herpetol*. 1998;32: 469–474. doi:10.2307/1565199
76. Hsu FH, Hsieh YS, Wu SH, Kam YC. Altitudinal variation in body size and age structure of the Sauter's frog *Rana sauteri* in Taiwan. *Zool Stud*. 2014;53: 1–9. doi:10.1186/s40555-014-0062-y
77. Altunışık A, Özdemir N. Life history traits in *Bufotes variabilis* (Pallas, 1769) from 2 different altitudes in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. 2015;39: 153–159. doi:10.3906/zoo-1402-57
78. Lai YC, Lee TH, Kam YC. A skeletochronological study on a subtropical, riparian ranid (*Rana swinhoana*) from different elevations in Taiwan. *Zoolog Sci*. 2005;22: 653–658. doi:10.2108/zsj.22.653
79. Özdemir N, Altunsk A, Ergül T, Gül S, Tosunoğlu M, Cadeddu G, et al. Variation in body size and age structure among three Turkish populations of the treefrog *Hyla arborea*. *Amphibia Reptilia*. 2012;33: 25–35. doi:10.1163/156853811X619790
80. Muñoz-Guerrero J, Serrano VH, Ramírez-Pinilla MP. Uso de microhábitat, dieta y tiempo de actividad en cuatro especies simpátricas de ranas hílidas neotropicales (Anura: Hylidae). *Caldasia*. 2007;29: 413–425.

81. Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmell NJ. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS One*. 2007;2: e1109. doi:10.1371/journal.pone.0001109
82. Funk WC, Caminer M, Ron SR. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012;279: 1806–1814. doi:10.1098/rspb.2011.1653
83. Guevara Chumacero LM, Sainoz Aguirre A. Especies crípticas: Diferentes especies con una misma forma. *Ciencia y Desarrollo*. 2012: 7–13.
84. Ron SR, Santos JC, Cannatella DC. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Mol Phylogenet Evol*. 2006;39: 392–403. doi:10.1016/j.ympev.2005.11.022
85. Heyer WR. Variation, systematics, and zoogeography of *Eleutherodactylus guentheri* and closely related species (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Smithson Contrib Zool*. 1984; 1–42. doi:10.5479/si.00810282.402
86. Angulo A, Cocroft RB, Reichle S. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Herpetologica*. 2003;59: 490–504. doi:10.1655/20-104
87. Beheregaray LB, Caccone A. Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology*. *BioMed Central*; 2007. pp. 1–5. doi:10.1186/jbiol60
88. Cei JMAM. *Herpetología patagónica*. *Physis*. 1972;31: 431–449.
89. Michael L. Arnold. Natural hybridization and evolution. *Choice Reviews Online*. 1997;35: 35-0883-35–0883. doi:10.5860/choice.35-0883
90. Lasso CA, Señaris JC. Vi . *Fauna Silvestre Del Escudo Guayanés*. 2018.
91. MacCulloch RD, Lathrop A. Hylid frogs from Mount Ayanganna, Guyana: New species, redescrptions, and distributional records. *Phyllomedusa*. 2005;4: 17–37. doi:10.11606/issn.2316-9079.v4i1p17-37
92. Lyra ML, Lourenço ACC, Pinheiro PDP, Pezzuti TL, Baêta D, Barlow A, et al. High-throughput DNA sequencing of museum specimens sheds light on the long-missing species of the *Bokermannohyla claresignata* group (Anura: Hylidae: Cophomantini). *Zool J Linn Soc*. 2020;190: 1235–1255. doi:10.1093/zoolinnean/zlaa033
93. Nan B, Emond MJ, Wellner JA. Information bounds for Cox regression models with missing data. *Ann Stat*. 2004;32: 723–753. doi:10.1214/009053604000000157
94. Rimieri P. La Diversidad Genética Y La Variabilidad Genética: Dos Conceptos Diferentes Asociados Al Germoplasma Y Al Mejoramiento Genético Vegetal* Genetic Diversity and Genetic Variability: Two Different Concepts Associated To Plant Germplasm and Breeding. *Journal of Basic and Applied Genetics*. 2017;XXVIII: 7–13.
95. Hoban S, Bruford M, D’Urban Jackson J, Lopes-Fernandes M, Heuertz M, Hohenlohe PA, et al. Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity

Framework must be improved. *Biol Conserv.* 2020;248: 108654.
doi:10.1016/j.biocon.2020.108654

96. Kok PJR, MacCulloch RD, Means DB, Roelants K, Van Bocxlaer I, Bossuyt F. Low genetic diversity in tepui summit vertebrates. *Current Biology*. Cell Press; 2012. pp. R589–R590. doi:10.1016/j.cub.2012.06.034
97. Funk WChris, Forester BR, Converse SJ, Darst C, Morey S. Improving conservation policy with genomics: a guide to integrating adaptive potential into U.S. Endangered Species Act decisions for conservation practitioners and geneticists. *Conservation Genetics*. Springer; 2019. pp. 115–134. doi:10.1007/s10592-018-1096-1
98. Miller CR, Joyce P, Waits LP. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*. 2002;160: 357–366. doi:10.1093/genetics/160.1.357
99. Miller CR, Waits LP. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 4334–4339. doi:10.1073/pnas.0735531100
100. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, McInnes KH. *Introduction to Conservation Genetics*. Oxford University Press. Cambridge University Press; 2002. doi:10.1017/cbo9780511808999

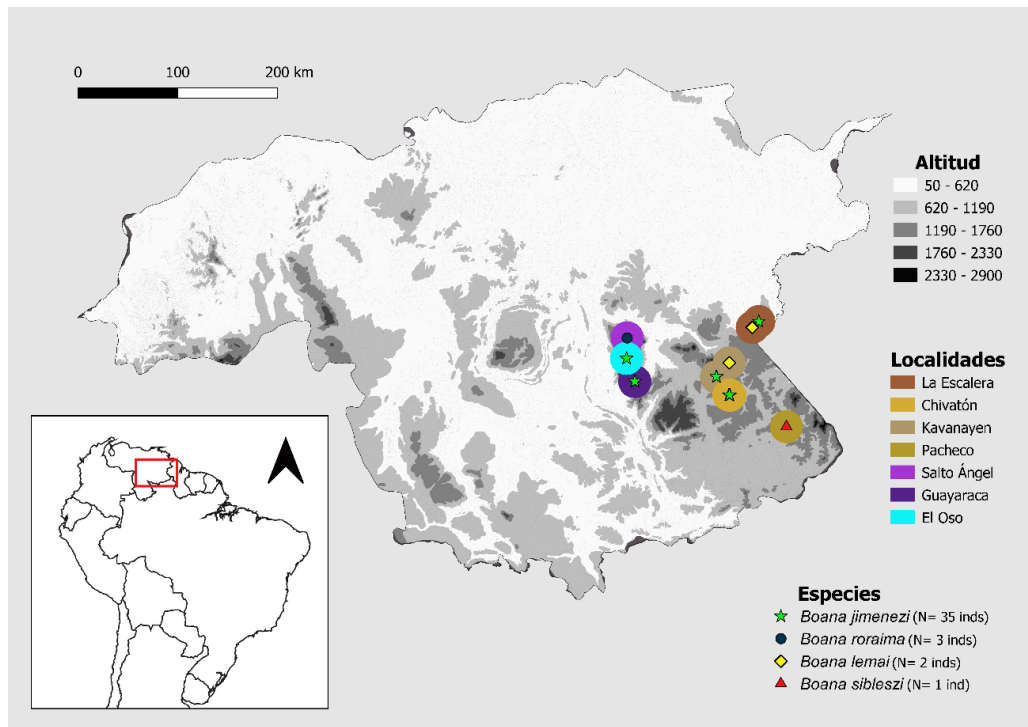
ANEXOS

ANEXO A: Localidad y zona de estudio de las 49 muestras recolectadas en la Gran Sabana venezolana.

El muestreo fue realizado por Patricia E. Salerno en junio de 2009 y junio de 2011. Las especies resaltadas de amarillo fueron eliminadas durante la secuenciación altamente variable.

Especie	Nro. De Campo	Localidad	Zona	Fecha
<i>Boana jimenezi</i>	TNHC05804, TNHC05805, TNHC00806, TNHC0807, TNHC0808	Guayaraca	Ladera	9-jun-09
<i>Boana jimenezi</i>	TNHC05837, TNHC05838, TNHC05839, TNHC05840, TNHC05841, TNHC05842, TNHC05843, TNHC05844, TNHC05845	El Oso	Cima	12-jun-09
<i>Boana jimenezi</i>	TNHC05927, TNHC05928, TNHC05929, TNHC05930, TNHC05931, TNHC05932, TNHC05933, TNHC05934, TNHC05935, TNHC05936	Chivatón	Sabana	20-jun-09
<i>Boana jimenezi</i>	PS172, PS173, PS174, PS175, PS176, PS177, PS178, PS179, PS180	Kavanayen	Sabana	22-jun-09
<i>Boana jimenezi</i>	PS193, PS196	La Escalera	Sabana	25-jun-09
<i>Boana sibleszi</i>	TNHC05890	Pacheco	Sabana	18-jun-09
<i>Boana sibleszi</i>	TNHC05937, TNH5938, TNH5939, TNH5940, TNHC05941	Chivatón	Sabana	20-jun-09
<i>Boana roraima</i>	PS283, PS284, PS285, PS297	Salto Ángel	Ladera	24-jun-11
<i>Boana lemai</i>	TNHC05887	Jaspe	Sabana	17-jun-09
<i>Boana lemai</i>	PS181	Kavanayen	Sabana	22-jun-09
<i>Boana lemai</i>	PS188	La Escalera	Sabana	25-jun-09
<i>Boana sp</i>	TNHC05951	Salto Kawi	Sabana	19-jun-09

Realizado por: Gallo, 2022.



ANEXO B: Localidad de las 41 muestras del género *Boana* recolectadas en el gradiente altitudinal.

Realizado por: Gallo, 2022.

El mapa fue creado con QGIS versión 3.10.8 [26]. Los colores de las localidades fueron asignados de acuerdo a la ubicación de cada individuo muestreado, la gama del color café corresponde a las localidades de la sabana (tierras bajas), la gama del morado para la zona de la ladera (tierras medias) y el color celeste para los que se encontraban en la cima (tierras altas). Las especies están representadas de la siguiente manera: *Boana jimenezi* (N=35 inds) con estrellas de color verde, *Boana roraima* (N=3 inds) con un círculo azul, *Boana lemai* (N=2 inds) con rombos amarillos y *Boana sibleszi* (N=1 ind) con un triángulo de color rojo vino.