



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZONICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERIA EN ECOSISTEMAS

**EXPLORACIÓN DE LA DIVERSIDAD CRÍPTICA EN POBLACIONES DE
ADENOMERA ANDREAE Y *ADENOMERA HYLAEDACTYLA* (ANURA:
LEPTODACTYLIDAE) EN ECUADOR: UNA APROXIMACIÓN TAXONÓMICA**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN ECOSISTEMAS

AUTOR: EMELY DANIELA PASMAI MARTÍNEZ

TUTOR: PhD HUGO MAURICIO ORTEGA ANDRADE

Tena - Ecuador

2024

Carrera de Ingeniería en Ecosistemas

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 15 de agosto de 2024

Yo, PASMAI MARTÍNEZ EMELY DANIELA, con documento de identidad N° 0950732248, 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.



Emely Daniela Pasmai Martínez

C.I. 0950732248

Carrera de Ingeniería en Ecosistemas

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 15 de agosto de 2024

Yo, PASMAI MARTÍNEZ EMELY DANIELA, con documento de identidad N° 0950732248, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Exploración de la diversidad críptica en poblaciones de *Adenomera andreae* y *Adenomera hylaedactyla* (Anura: Leptodactylidae) en Ecuador: Una aproximación taxonómica”. 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.



Emely Daniela Pasmai Martínez

C.I. 0950732248

Carrera Ingeniería en Ecosistemas

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Certifico que el Trabajo de titulación “Exploración de la diversidad críptica en poblaciones de *Adenomera andreae* y *Adenomera hylaedactyla* (Anura: Leptodactylidae) en Ecuador: Una aproximación taxonómica”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de artículo científico, fue realizado por Emely Daniela Pasmai Martínez, 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, 15 de agosto de 2024



Hugo Mauricio Ortega Andrade

C.I 1717270811

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me han brindado para el desarrollo del presente trabajo de investigación. Agradezco especialmente a mis padres, Manuel y Rosa, por ser pilares en mi vida. También agradezco a mi tía Elba Pazmay, mis sobrinos, hermana y cuñado por motivarme a seguir adelante con mis estudios. Quiero expresar mi gratitud a mi amigo Klinton Ochoa por ser parte del trabajo de investigación y por ser un gran amigo.

Agradezco a mi tutor Mauricio Ortega por enseñarme y educarme. También por todo su apoyo y motivación para culminar con éxito este proceso de investigación.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todos los investigadores que están trabajando con especies crípticas. Esta dedicación tiene como objetivo seguir construyendo y motivando a más investigadores a trabajar con taxonomía integrativa e implementar más trabajos e información para el futuro de nuestra biodiversidad. A mis maestros que formaron parte de mi vida estudiantil y que aportaron con sus conocimientos para poder cumplir una etapa de mi vida.

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 titulación..... iv

AGRADECIMIENTO v

DEDICATORIA vi

ÍNDICE DE TABLA viii

ÍNDICE DE FIGURAS..... ix

RESUMEN xi

ABSTRACT..... xii

INTRODUCCIÓN 13

MÉTODOS..... 17

2.1 Área de estudio 17

2.2 Amplificación y secuenciación de ADN 19

2.3 Bioinformática 20

2.4 Reconstrucción filogenética y distancias genéticas..... 21

2.5 Morfología..... 22

2.6 Bioacústica 23

2.7 Biogeografía 24

2.8 Límites de especies candidatas..... 24

RESULTADOS 26

3.1 Análisis filogenéticos..... 26

3.2 Distancias patrísticas..... 30

3.3 Análisis morfológico..... 32

3.4 Análisis bioacústico..... 36

3.5 Análisis biogeográfico 38

DISCUSIÓN..... 40

CONCLUSIONES..... 43

REFERENCIA.....

APÉNDICES

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Lista de modelos de mejor ajuste por partición. En donde AIC+ w-AIC son puntuaciones y ponderaciones del criterio de información de Akaike, AICc + w-AIC representan puntuaciones y ponderaciones AIC corregidas y BIC + w-BIC son puntuaciones y ponderaciones de los criterios de información bayesianos. Los signos + indican los conjuntos de confianza del 95% y los signos - indican una exclusión significativa.....	26
Tabla 2. Distancias patrísticas de los genes 16S + 12S + COI del ADNmt. El color representa las distancias patrísticas entre Clados (2 y 9), que incluyen poblaciones ecuatorianas, y el Clado de <i>Adenomera simonstuarti sensu stricto</i> (Clado 6). Los valores se presentan como $X \pm SD(\text{min-max})$	31
Tabla 3. Rasgos morfométricos (sólo machos adultos) de dos especies de <i>Adenomera</i> de la Amazonia brasileña y peruana, y del ecotono de la sabana guayanesa en el estado brasileño de Roraima (<i>A. andreae</i> y <i>A. hylaedactyla</i>) (véase Carvalho, 2019); dos especímenes machos tipo de <i>A. simonstuarti</i> de la localidad tipo Campamento Segakiato, río camisea, distrito de Echarate, provincia de la convención, región del Cusco, Perú y cuatro especímenes hembras (véase Angulo e Icochea, 2010). Los datos son presentados como promedio $\pm SD$ (min-max). Se incluyó dos linajes (Clado 2 y 9) relacionados geográfica y filogenéticamente con el linaje de <i>A. simonstuarti</i> (clado 6) en Ecuador, con una serie de sesenta especímenes de machos adultos y ocho especímenes de hembras adultas. Los rasgos morfométricos se definen en Materiales y Métodos. *= Holotipo de <i>A. hylaedactyla</i> (ANSP2240). †=Diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al Clado 9 de Ecuador. ‡= Diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al Clado 2 de Ecuador.	35
Tabla 4. Medición de los parámetros acústicos de las vocalizaciones del holotipo de <i>Adenomera simonstuarti</i> (véase Angulo e Icochea, 2010) e individuos del Clado 9 provenientes de Ecuador. Los datos se presentan como $X \pm SD(\text{min-max})$. Entre los parámetros acústicos comparados para las dos especies existen diferencias significativas (F and T tests; $P < 0.05$). Las definiciones de parámetros acústicos pueden observarse en (Apéndice, Tabla 2). *= Holotipo de <i>A. simontuarti</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de colectas establecidos. Se colectaron 20 especímenes dentro de la ciudad Tena, Ecuador	17
Figura 2. Área de estudio de las poblaciones de <i>Adenomera spp.</i> en Ecuador. El cuadrado azul representa los puntos de colecta bioacústicos; el círculo rojo representa la información genética recopilada y el triángulo negro son datos morfológicos. Dentro del rectángulo gris están los sitios de colectas (Fig. 1), donde se presentan datos morfológicos, genéticos y bioacústicos de la especie.....	18
Figura 3. Árbol filogenético del género <i>Adenomera</i> a partir de una matriz de caracteres genéticos del 16S rRNA, 12S rRNA y Citocromo Oxidasa I (COI) para poblaciones de la Amazonía. Se muestra divergencia filogenética dentro del complejo de especies de <i>A. simonstuarti</i> con linajes distribuidos desde las regiones occidentales de la Amazonía, hasta las tierras bajas en el Amazonas (Fig. 4). Los valores de soporte de cada rama se muestran como SH-aLRT (Test de rama única) / UFBoot (bootstrap ultra rápido). Los valores de soporte del árbol por Clado son mayores a 50%/50%. Se ha colapsado el Clado <i>A. andreae</i> , mismo que, junto con el linaje de <i>Adenomera hylaedactyla</i> , son detallados en Apéndice Fig. 3 (B) El cuadro azul resaltado pertenece al Clado de <i>Adenomera simonstuarti sensu lato</i> , mismo que incluye los 9 clados principales detallados en (A).....	28
Figura 4. Distribución geográfica del complejo de especies en el Clado de <i>Adenomera simonstuarti sensu lato</i> en Sudamérica. El Clado 6 corresponde a la especie nominal <i>A. simontuarti</i> y la población tipo [36]. Los números que se encuentran a un costado del árbol filogenético corresponden al número de Clado al cual corresponden. Los polígonos (buffer 50 km) representan las distribuciones de las poblaciones ubicadas por color en el árbol filogenético de la Figura 2.....	29
Figura 5. Especímenes evaluados por comparación de datos morfométricos de los Clados 2 y 9 mediante componentes principales en (A, B) machos de <i>Adenomera spp</i> localizados en la región amazónica ecuatoriana. Las variables morfométricas que mejor explicaron la varianza en los datos se muestran en consecuencia con cada eje.....	33
Figura 6. Especímenes evaluados por comparación de datos morfométricos de los Clados 2 y 9 mediante componentes principales en (C, D) hembras de <i>Adenomera spp.</i> localizados en la región amazónica ecuatoriana. Las variables morfométricas que mejor explicaron la varianza en los datos se muestran en consecuencia con cada eje.....	34
Figura 7. Espectrograma del holotipo MHNSM 18218 <i>Adenomera simonstuarti</i> , fue grabado a las 18:20 h del 11 de octubre de 1997 a una temperatura ambiente de 27 °C, debajo de la hojarasca junto a un tronco podrido [24]. Se muestra una llamada caracterizada por tres notas pulsadas y una fuerte modulación de los kHz. (B) Espectrograma de un espécimen macho de la población del Tena <i>Adenomera sp.</i> (Clado 9), grabada a las 19:46 h del 22 de marzo 2023 a una temperatura de 26°C, en pastizal seco. Se muestra una llamada caracterizada por siete notas pulsadas y una modulación con un incremento leve visible de los kHz.....	38

Figura 8. (A) Relaciones entre las variables climáticas mediante componentes principales en los linajes del Clado de *A. simonstuarti sensu lato* (B). Estructura del árbol filogenético presentado en el mapa geográfico de la Figura 3, y (C) Gráfica de caja y violines mostrada por Clados para representar la variación en la precipitación anual (BIO12, mm). Cada Clado presente en la filogenia (B) tiene un número y color asociado a la gráfica de variables climáticas (A y C).....39

RESUMEN

El aumento de la población humana está provocando una crisis en la biodiversidad mundial debido a la pérdida de diversidad genética en especies y ecosistemas. En la actualidad la Amazonía es considerada la zona más diversa a nivel mundial, pero, también una de las más amenazada. En zonas de alta diversidad, también se ha documentado que hay una alta probabilidad de encontrar especies nuevas y complejos taxonómicos, que pudieran tener especies confundidas bajo uno o varios nombres nominales denominadas especies crípticas. Es por ello, que la taxonomía integrativa usa distintas líneas de evidencia (genética, filogenética, biogeografía, bioacústica, etc) para probar hipótesis de diversidad críptica como protocolo metodológico, en este caso en ranas del género *Adenomera* (Leptodactylidae) que tienen una amplia distribución. En este estudio, reconocemos 9 clados en un grupo monofilético que incluye a la especie nominal *Adenomera simonstuarti sensu stricto* y dos linajes provenientes de Ecuador. Aplicando taxonomía integrativa proponemos que el Clado 2, localizado al norte del río Napo en Ecuador, corresponde a una especie candidata no confirmada, mientras que el Clado 9, localizado al sur del río Napo, correspondería a una especie candidata confirmada. Las evidencias filogenéticas, biogeográficas, bioacústicas determinan que *Adenomera andreae* y *A. hylaedactyla* no son parte de la batracofauna de Ecuador. Esta investigación aportó información de base para determinar que la diversidad de este grupo está subestimada en Ecuador y en la Amazonía.

Palabras claves: Especies, especies crípticas, taxonomía integrativa, filogenética, morfología, bioacústica, biogeografía

ABSTRACT

The increase in the human population is causing a global biodiversity crisis due to the loss of genetic diversity in species and ecosystems. Currently, the Amazon is considered the most diverse region worldwide, but it is also one of the most threatened. In areas of high diversity, it has also been documented that there is a high probability of finding new species and complex taxonomies, which may have species confused under one or more nominal names, known as cryptic species. This is why integrative taxonomy uses different lines of evidence (genetic, phylogenetic, biogeography, bioacoustics, etc.) to test hypotheses of cryptic diversity as a methodological protocol, in this case in frogs of the genus *Adenomera* (Leptodactylidae), which have a wide distribution. In this study, we recognize 9 clades in a monophyletic group that includes the nominal species *Adenomera simonstuarti* sensu stricto and two lineages from Ecuador. By applying integrative taxonomy, we propose that clade 2, located north of the Napo River in Ecuador, corresponds to an unconfirmed candidate species, while clade 9, located south of the Napo River, corresponds to a confirmed candidate species. Phylogenetic, biogeographic, and bioacoustic evidence determine that *Adenomera andreae* and *A. hylaedactyla* are not part of the batrachofauna of Ecuador. This research provided baseline information to determine that the diversity of this group is underestimated in Ecuador and the Amazon.

Key words: Species, cryptic species, integrative taxonomy, phylogenetics, morphology, bioacoustics, biogeography.

EXPLORACIÓN DE LA DIVERSIDAD CRÍPTICA EN POBLACIONES DE ADENOMERA ANDREAE Y ADENOMERA HYLAEDACTYLA (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) EN ECUADOR: UNA APROXIMACIÓN TAXONÓMICA

Emely Pasmai Martínez

INTRODUCCIÓN

La región amazónica es una de las zonas con mayor riqueza y diversidad del planeta, alberga una vasta cantidad de especies y ecosistemas. Este bioma cubre aproximadamente 6.7 millones de km² [1]. La Amazonía juega un papel crucial en la regulación del clima global, actuando como uno de los mayores sumideros de carbono del planeta. Los bosques amazónicos almacenan una enorme cantidad de carbono en su biomasa, contribuyendo significativamente a la absorción de dióxido de carbono de la atmósfera [2].

Con el crecimiento poblacional en auge, la biodiversidad a nivel mundial está en crisis, debido a la pérdida de diversidad genética de especies y ecosistemas en todo el mundo [3]. En la actualidad la Cuenca Amazónica es considerada la más diversas en anfibios [4–9], pero, también una de las más amenazada debido a perturbaciones en los ecosistemas de origen antrópicos [10,11]. Ecuador, al ser un país considerado mega diverso con 676 especies de anfibios reportadas hasta junio del 2023 (8% de la diversidad mundial en anfibios) [12], ha demostrado que tiene una alta probabilidad de encontrar especies nuevas, entre las cuales varios grupos son considerados como complejos de especies crípticas [13–17].

El concepto unificado de una especie está dado como un linaje metapoblacional que evoluciona de manera independiente, donde sus límites están determinados por diferentes líneas de evidencia (morfología, ecología, reproductiva, biológica, etc.) relevantes para evaluar su separación [18]. En este contexto, las especies crípticas son definidas como dos o más especies distintas que son confundidas y clasificadas de manera errónea bajo el nombre de una sola, a pesar de que se espera sean linajes independientes [19]. En contraste a la taxonomía clásica, basado en líneas de evidencia morfológica [20], se plantea recientemente a la taxonomía integrativa como protocolo metodológico propuesta por (Dayrat, 2005) [21], para estudiar la diversidad de la vida desde múltiples disciplinas complementarias, tales como la morfometría, biogeografía, genética, bioacústica, filogenética, entre otras [13–16].

Uno de los problemas al detectar especies crípticas dentro de un grupo o linaje es la posible subestimación de diversidad [19], es decir, se considera un menor número de especies, cuando hay más especies confundidas dentro del grupo, por lo que existen vacíos de conocimiento con respecto a la riqueza real de especies y sus relaciones filogenéticas [22]. Además, desde el punto de vista biogeográfico, las áreas de distribución de la especie cambiarían, lo que pudiera influir en las consideraciones para asignar su estado de conservación [23]. Un problema común con grupos de alta diversidad y con amplia distribución es la posible presencia de especies crípticas, por lo que la falta de identidad taxonómica a nivel de especie, promueve además limitaciones en recursos para su conservación [23].

Con casi el 33% de especies nominales de anfibios a nivel mundial catalogadas como amenazadas [24], la disminución y la extinción de anfibios es un fenómeno reconocido como crisis de biodiversidad [24]. Los anuros suelen mostrar patrones biogeográficos distintos al resto de invertebrados ya que tienden a optar por preferencias ambientales y características que se asocian a su limitada capacidad de dispersión [22]. Estos patrones provocan que la población se vuelva vulnerable a eventos históricos evolutivos, que ocasionan firmas espaciales y temporales en sus patrones de distribución y relaciones filogenéticas [22].

El caso de las especies del género *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) no es la excepción, al posiblemente enmascarar varias especies crípticas, por lo que repercute no solo en la delimitación de las especies nominales, sino también en la estabilidad taxonómica de otras especies en la Región Amazónica [14].

Cope en 1868 [25] se encargó de describir a *Adenomera hylaedactyla* perteneciente a la familia Leptodactylidae (Amphibia: Anura), cuya localidad tipo es específicamente desconocida, suponiendo proviene del río Napo o Alto Marañón, Perú [25]. Se encuentra ampliamente distribuida en bosques amazónicos a través de las Guayanas en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil [26]. Según la lista roja de especies amenazadas de la UICN [23] no se encuentra en peligro de extinción debido a su distribución.

Por otra parte, Müller describió en 1923 [27] a *Adenomera andreae*, una especie que se relacionaba con *A. hylaedactyla*, proveniente de Peixeboi (ad Bragançabahn), estado de Parà en Brasil. *A. andreae* es un anfibio con amplia distribución al este de los Andes [14], y conforma el género *Adenomera*, junto con 21 especies nominales [13]. Esta especie es de preocupación menor (LC) dada su amplia distribución [23]. Según Frost [28], el holotipo (ZSM 136/1911) se encuentra actualmente perdido, aunque se ha designado como Neotipo a ZSM 145/1911 [29].

Angulo y Icochea [24] en 2010 describieron a la especie nominal *Adenomera simontuarti* cuyo holotipo (MHNSM 18218) proviene de la localidad tipo en el Campamento Segakiato a 340 msnm, río camisea, distrito de Echarate, provincia de la convención, región del Cusco, Perú [24]. Según la lista roja de especies amenazadas de la UICN esta especie es de preocupación menor (LC) y no se encuentra en peligro de extinción [23]. Esta especie se encuentra principalmente en los bosques primarios y secundarios de las tierras bajas del Amazonas, pero también se puede encontrar en hábitats perturbados [30].

Según Heyer [29], taxonómicamente *A. andreae* y *A. hylaedactyla* pertenecía al grupo *Leptodactylus marmoratus*, pero con la investigación posterior de Heyer [31], resurgió el

género *Adenomera*. Éste se considera como un complejo de especies, dada la gran diversidad morfológica poblacional e interespecífica [32]. Por otra parte, el estudio de Fouquet [33] sugiere que tanto *Adenomera andreae* como *Adenomera hylaedactyla* no se encontrarían en Ecuador, siendo *Adenomera simonstuarti* una especie relacionada a este grupo que debería ser reconocida para el país, por lo que la identidad de las poblaciones ecuatorianas está en debate.

En este sentido, aportar al conocimiento sobre los límites de especies en este complejo taxonómico contribuiría a la confirmación de la presencia o ausencia de *A. andreae* y *A. hylaedactyla* en Ecuador, cuyo estatus es incierto, mientras que *A. simonstuarti* aún no ha sido formalmente reportada formalmente para el país [33]. En este trabajo se explora la diversidad críptica en poblaciones reconocidas como *A. andreae* y *A. hylaedactyla* en Ecuador con el fin de analizar su posición filogenética dentro del linaje de ranas *Adenomera* en la Amazonía. Además, contribuirá en la generación de nueva información bioacústica, genética, morfológica y biogeográfica de *Adenomera*, como base para probar los límites de especies y distribución de grupo en Ecuador.

MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Las colectas (Fig. 1) fueron realizadas en la provincia de Napo, Ecuador, dentro de la ciudad de Tena ($S0^{\circ}59'37.68$; $O77^{\circ}48'46.3$), en un rango altitudinal de entre los 500 a 600 msnm y una precipitación anual de entre los 3,500 a 4,000 mm [34]. Se colectaron 20 individuos de la población de Tena para los análisis filogenéticos y morfológicos y para los análisis bioacústicos se realizaron 5 grabaciones entre los puntos de colectas establecidos (Fig. 1). Adicionalmente se revisaron especímenes de las colecciones del Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) hasta diciembre del 2023, repositorios digitales del QCAZ (Bioweb) [12] y el National Center for Biotechnology Information (NCBI Genbank) [35] (Fig. 2) para obtener información adicional morfológica, genética y bioacústica en otras poblaciones de la región Amazónica ecuatoriana. La distribución de los datos genéticos y morfológicos abarcaron especímenes distribuidos para toda la Cuenca Amazónica (Fig. 4 y Tabla 3), publicados en [15,36].

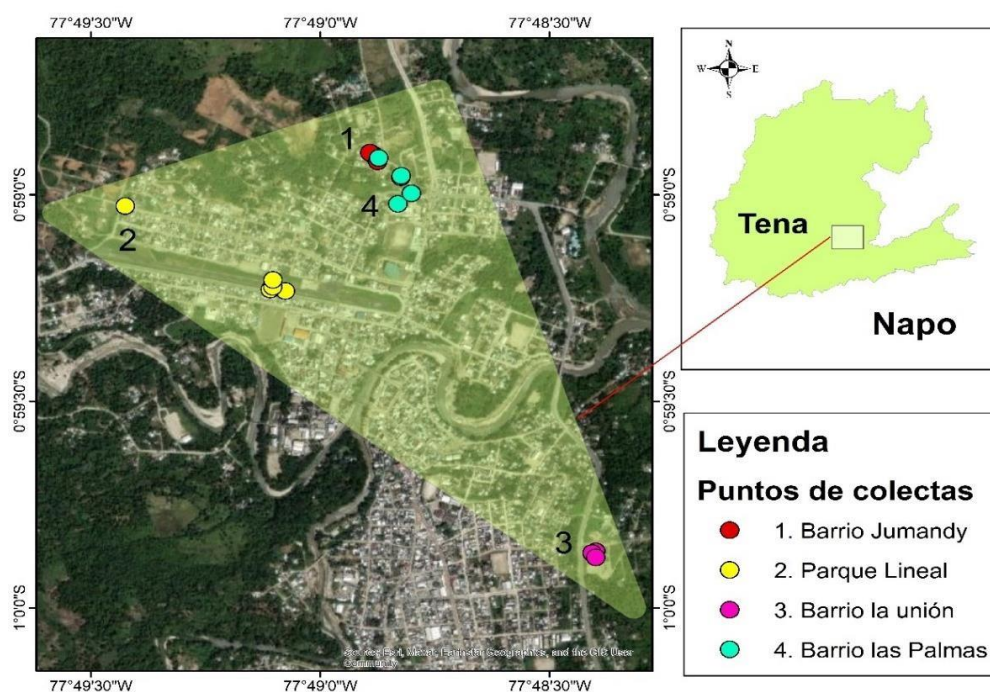


Figura 1. Puntos de colectas establecidos. Se colectaron 20 especímenes dentro de la ciudad Tena, Ecuador.

Realizado por: Pasmai, 2024.

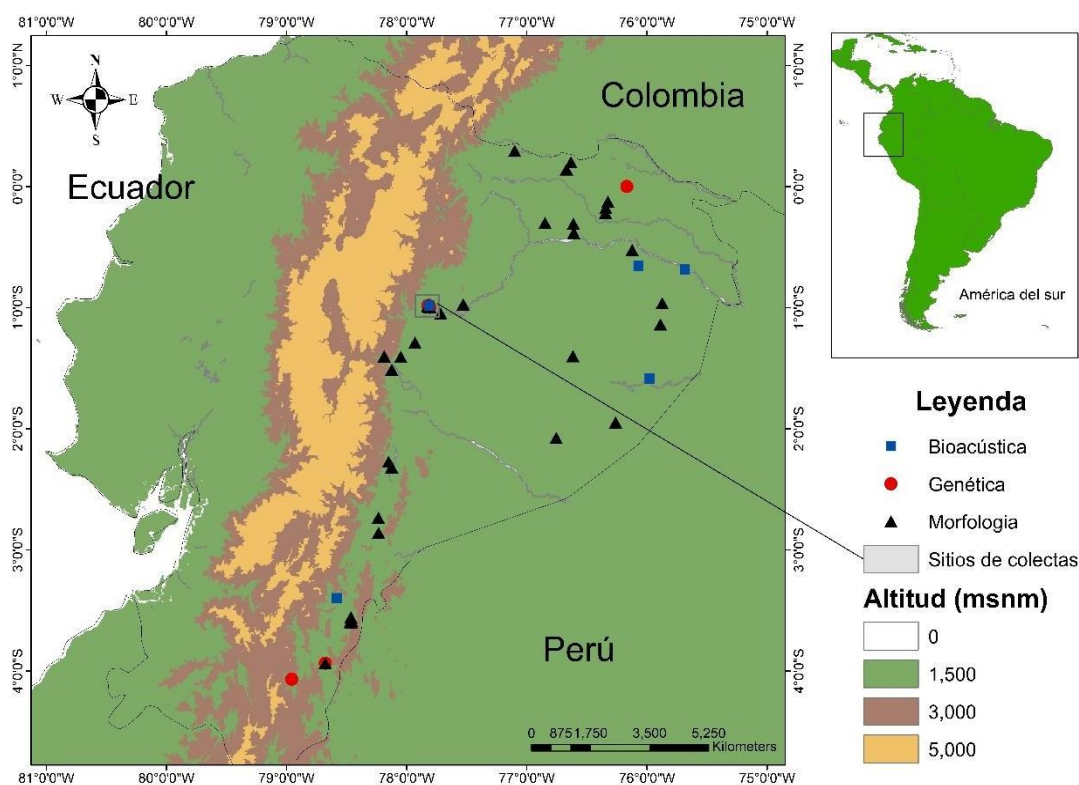


Figura 2. Área de estudio de las poblaciones de *Adenomera* spp. en Ecuador. El cuadrado azul representa los puntos de colecta bioacústicos; el círculo rojo representa la información genética recopilada y el triángulo negro son datos morfológicos. Dentro del rectángulo gris están los sitios de colectas (Fig. 1), donde se presentan datos morfológicos, genéticos y bioacústicos de la especie.

Realizado por: Pasmai, 2024

Los permisos de colecta de especímenes en campo los proporcionó el MAATE (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica) con números MAATE-DBI-CM-2021-0177 y MAE-DNB-CM-2019-0120.

La colecta en campo fue realizada siguiendo la técnica denominada “Búsqueda por encuentro visual” [37], entre noviembre de 2022 y abril de 2023. El muestreo fue desarrollado desde las 18:00 hasta las 22:00 por sitio (Figura 1), para la colección de especímenes y su registro bioacústico. Se recopilieron datos como coordenadas geográficas de cada punto de muestreo (latitud/longitud), altitud, fecha, hora, asignación de una etiqueta única numérica secuencial para cada individuo de campo, localidad, descripción detallada del lugar en donde se encontró el espécimen, notas sobre color y ecología de la especie y su registro fotográfico [37].

Los especímenes procesados se obtuvieron siguiendo protocolos éticos y técnicos (McDiarmid, 1994) [38]. Los ejemplares fueron transportados al laboratorio dentro de las siguientes 24 horas al día siguiente de la captura para fotografiarlos. La eutanasia de los especímenes fue realizada con un anestésico local (Lidocaína al 2%) aplicando de manera tópica sobre la piel del espécimen. Se realizó la extracción del tejido hepático de cada ejemplar y se almacenó en microtubos de 2 ml con etanol al 96% a 4°C. Los especímenes fueron fijados con etanol al 96% y conservados permanentemente en etanol al 70%. Finalmente, cada espécimen fue etiquetado con el código único que se le asignó en campo [16]. Los especímenes colectados fueron depositados en la colección científica del Laboratorio de Biología Integrativa Ikiam y en el Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO).

2.2 Amplificación y secuenciación de ADN

Para realizar la extracción de ADN genómico se siguió el protocolo del kit Promega Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EE. UU.), con 5mg de muestra de tejido hepático. Previo a este proceso se realizó la maceración e incubación de muestras preparando un mix de EDTA 0.5 M (ph 8.0)/Nucleic lysis solution y Proteinasa k. Se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis de microvolumen NanoDrop™ One/OneC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para determinar la pureza y la cantidad del ADN genómico previo a la extracción. Se usaron marcadores moleculares para amplificar las regiones mitocondriales de 16S rRNA, 12S rRNA y Citocromo Oxidasa I (COI), que incluyeron los adaptadores “Forward” TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC y “Reverse” ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC para secuenciación con Tecnología Oxford Nanopore (PCR barcoding amplicons; (<https://nanoporetech.com/>)). Para la amplificación de un fragmento de 600 pb del ARN ribosomal (16S rRNA) se usó un termociclador MiniPCR. El volumen de reacción final fue de 12,5 µL y consistió 4,25 µL de agua, 6,25 µL de Tag polimerasa, 1 µL de ADN genómico, 0,4 del marcador 16sSar-L (5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3') y 0,4 del marcador 16sSbr-H (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT- 3') [39]. El programa del termociclador fue el siguiente: 30s a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30s a 59 °C en 30 ciclos

y 45s a 72 °C en 30 ciclos. Se realizó una extensión final durante 5 min a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. Para el (12S rRNA) se utilizó el mismo volumen de reacción final y los marcadores utilizados fueron 12SL4E (5'-TAC ACA TGC AAG TYT CCG C-3') y 12SH10 (5'-CAC YTT CCR GTR CRY TTA CCR TGT TAC GAC TT-3') [40]. El programa del termociclador fue el siguiente: 5 min a 94 °C, seguido de 30 s a 94 °C, 30s a 49 °C y 1 min a 72 °C. Se realizó una extensión final durante 7 min a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. Finalmente, para el marcador Citocromo Oxidasa I (COI)) el volumen de reacción final fue de 13 µL y consistió 3,5 µL en agua, 6,5 µL de Tag polimerasa, 2 µL de ADN genómico, 0.5 µL del marcador dgLCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG AYA TYG G) y 0.5 µL del marcador dgHCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAR AAY CA) [39]. El programa del termociclador fue el siguiente: 5 min a 95 °C, seguido de 1 min a 95 °C, 1 min a 48 °C y 1 min a 72 °C. Se realizó una extensión final durante 10 min a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2 % con el sistema de electroforesis BlueGel [™] (MiniPCR, Cambridge, MA, EE. UU.) utilizando la tinción Diamond [™] Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

La secuenciación fue realizada con un equipo MinION Mk1B con Tecnología Oxford Nanopore (<https://nanoporetech.com/>). Las secuencias se compararon con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mediante el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para asignar las especies más similares genéticamente a cada muestra recolectada. Se utilizó un umbral de >98% de identidad por pares para asignar especies.

2.3 Bioinformática

El análisis bioinformático se realizó de forma independiente para cada muestra secuenciada. Se descomprimieron y concatenaron los archivos, luego se utilizó la herramienta NGSpeciesID (<https://github.com/ksahlin/NGSpeciesID>) para agrupar y formar datos consensos de secuenciación de amplicones. Se aplicó Porechop (<https://github.com/rrwick/Porechop>) para cortar o eliminar adaptadores de lecturas del nanopore. Finalmente se aplicó NanoPlot (<https://github.com/wdecoster/NanoPlot>)

para visualizar el gráfico bivariado que compara la longitud de lectura transformada logarítmicamente con el puntaje de calidad promedio de Phred de la llamada base y utilizar el paquete NanoFilt (<https://github.com/wdecoster/nanofilt>) para filtrar las lecturas según sus puntuaciones de calidad ($Q > 12$) y eliminar todas las lecturas por debajo de 200 nucleótidos.

2.4 Reconstrucción filogenética y distancias genéticas

La edición, ensamblaje y alineamiento de secuencias fueron realizadas en Geneious Prime 2023.2 [41] con 1,026 secuencias analizadas de Genbank, campo y grupo externo. Para el marcador molecular COI se analizaron 609 secuencias, 16S con 227 secuencias y 12S con 190 secuencias. Se elaboró la matriz final concatenada en el programa Mesquite versión 3.70 [42]. La estimación del modelo de sustitución nucleotídica y la reconstrucción filogenética fueron realizadas con ModelFinder [43] en el servidor de IQtree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) [44], se subió la matriz de alineamiento y el archivo de partición en el servidor empleando el algoritmo de Máxima Verosimilitud. Los parámetros empleados en el análisis de soporte de ramas en IQtree fueron un soporte de las ramas mediante un test de rama única Shimodaira – Hasegawa (SH-aLRT) [45,46] con 1000 réplicas, análisis bootstrap ultrarrápido, el número de alineamiento bootstrap de 1000, 1000 Iteraciones máximas y un Coeficiente de correlación mínimo 0.99. La matriz genética tuvo cinco particiones, una por cada gen no codificante (12S y 16S), y tres para los codones del gen codificante (COI). Los valores de soporte fueron estimados a partir de 1000 Bootstrap. Finalmente, el árbol filogenético se visualizó y editó con el programa FigTree v1.4.4 [47]. Se consideraron los genes COI, 16S Y 12S para *Lithodytes lineatus* (KU494587, KU495380 y AY943228), *Hydrolaetare caparu* (KC603988, KC603954 y KC603953), *Leptodactylus fuscus* (KU494530, KU495323 Y AY905695), *Scythrophrys sawayae* (KU494787, KU495580 y MN917609) y *Physalaemus nattereri* (KU494649, KU495442 y MT992175) como grupo externo [15].

Se subió un árbol filogenético al programa Geneious Prime 2023.2 [41] para el cálculo de distancias patrísticas. Se ha determinado la existencia de un umbral $>3\%$ [48], aunque

otros estudios determinan que ese umbral pudiera ser menor al 2% para ranas Neotropicales, por ejemplo, del género *Pristimantis* [16].

2.5 Morfología

Para realizar las mediciones morfológicas se siguieron las definiciones y terminologías de variables morfométricas utilizadas en el estudio de Carvalho, [14]. Las medidas fueron tomadas con un calibrador pie de rey con una precisión de ± 1 mm y un estereomicroscopio: Longitud del hocico (SVL) = distancia desde la punta del hocico hasta el margen posterior de la cloaca; ancho de la cabeza (HW) = distancia del ancho de la cabeza medida a nivel de la mandíbula; longitud de la cabeza (HL) = medida desde el margen posterior de la mandíbula inferior a la punta del hocico; diámetro del ojo (ED) = distancia entre los bordes anterior y posterior del ojo; distancia del ojo nostril (EN) = distancia del margen posterior de la fosa nasal al margen anterior del ojo; longitud de la tibia (TL) = longitud de la pierna flexionada desde la rodilla hasta el talón; distancia internarial (IND) = distancia entre las dos narinas; longitud de la mano (HAL) = desde el borde proximal del tubérculo palmar a la punta del dedo III; longitud de la cabeza (HL) = distancia desde el margen posterior de la mandíbula inferior a la punta del hocico; diámetro del tímpano (TD) = distancia horizontal entre los márgenes externo anterior y posterior del anillo timpánico; longitud del pie (FOL) = distancia desde el talón al dedo IV de la pata trasera; longitud del fémur (FL) = medida desde el cloaca hasta la rodilla; distancia Inter orbital (IOD) = anchura de la entre las órbitas; y, anchura del párpado superior (EW) = distancia perpendicular del párpado superior. Asimismo, se añadirá la anchura del disco del dedo III (F3D) = medida a través de la parte más ancha del disco III; anchura del disco del dedo IV (T4D) = medida en la parte más ancha del disco IV y longitud del pie (MEL) = medida desde el tubérculo metatarsal interno a la punta del dedo III.

Se midieron 16 parámetros morfométricos por espécimen colectados dentro de la ciudad de Tena y los analizados en el Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO), para la ciudad del Tena se contaron con 17 especímenes, y en el INABIO 51 especímenes entre

machos y hembras. Realizamos un análisis de componentes principales (APC) con datos morfométricos medidos entre machos y hembras para comparar el dimorfismo sexual del linaje correspondiente a la población del Tena. Para analizar el patrón morfológico entre poblaciones Amazónicas se usaron 8 parámetros morfométricos (SVL, EN, ED, TD, HAL, THL, TL y FoL) reportados por Carvalho [15]. Los análisis estadísticos se realizaron con PAST Software v18.0 [49].

2.6 Bioacústica

Las vocalizaciones de los especímenes fueron grabadas con una grabadora Tascam DR-05, con una frecuencia de muestreo de 44.1 kHz en 16 bit de resolución [13–16] en formato WAV. Las grabaciones fueron realizadas durante los días de colectas entre las 18:00 – 22:00, se colectaron 5 grabaciones con su respectivo voucher (especimen). La duración de las grabaciones fue de 3 minutos y se registró la fecha, hora, ID código de grabación, descripción del hábitat en dónde se encuentra el espécimen, localidad [50] y etiquetado de las grabaciones realizadas en campo siguiendo las anotaciones de Lips *et al*, [51]. Información adicional recopilada desde repositorios digitales como la BIOWEB, se decidió tomar las grabaciones que tengan Voucher.

El ruido de fondo fue filtrado a -6 db en el programa Oceanaudio 3.13.8 [52]. Los análisis bioacústicos y los parámetros digitalizados fueron procesados en Raven Pro 1.6.4.[53] configurando el espectrograma de la siguiente manera [16]: Size = 512 samples, Hop size = 256 samples, overlap = 50%, window type = Hann, contrast = 33, set brightness = 62, Rate = 1.0. Por otra parte, seguimos las definiciones y terminologías del trabajo de Cocroft [50] para los siguientes parámetros bioacústicos: longitud de canto (ms); tiempo del pico de la vocalización (ms); tasa de vocalización (cantos/minutos); frecuencia fundamental (Hz) (1 armónica); frecuencia armónica 2; frecuencia armónica 3; frecuencia dominante; cambios en la frecuencia dominante (Hz) (Apéndice, Tabla 2). Se generó una base de datos bioacústica con ocho parámetros para comparar las poblaciones de la ciudad del Tena y lo reportado por Angulo & Icochea [24] para saber si

existe diferencia significativa entre parámetros acústicos. Los análisis estadísticos se realizaron con PAST Software v18.0 [49].

2.7 Biogeografía

Para los análisis biogeográficos se descargaron 19 variables bioclimáticas estándar de WorldClim versión 2 [54] BIO1 = temperatura media anual; BIO2 = Rango diurno medio (media mensual (temp. máx. - temp. mín.)); BIO3 = Isotermia (BIO2/BIO7) ($\times 100$); BIO4 = Estacionalidad de la temperatura (desviación típica $\times 100$); BIO5 = temperatura máxima del mes más cálido; BIO6 = temperatura mínima del mes más frío; BIO7 = rango anual de temperaturas (BIO5-BIO6); BIO8 = temperatura media del trimestre más húmedo; BIO9 = temperatura media del trimestre más seco; BIO10 = temperatura media del trimestre más cálido; BIO11 = temperatura media del trimestre más frío; BIO12 = precipitación anual; BIO13 = precipitación del mes más húmedo; BIO14 = precipitación del mes más seco; BIO15 = estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación); BIO16 = precipitación del trimestre más húmedo; BIO17 = precipitación del trimestre más seco; BIO18 = precipitación del trimestre más cálido y BIO19 = precipitación del trimestre más frío.

La base de datos contiene información de especímenes colectados en Ecuador, Perú, Venezuela, Colombia y Brasil [36]. Se extrajo la información climática de la base de datos geográfica de los especímenes con el programa ArcMap versión 10.5 [55]. Las diferencias climáticas fueron analizadas con componentes principales (ACP) con PAST Software v18.0 [49].

2.8 Límites de especies candidatas

Según las definiciones para delimitar especies crípticas propuesta por Vieites *et al.* [48] en este trabajo se aplicaron para: (1) especies candidatas no confirmadas (UCS, Unconfirmed Candidate Species) las cuales presentan distancias genéticas no corregidas en el gen 16S rRNA $>3\%$, donde no hay datos sobre morfología y/o bioacústica debido a la falta de especímenes o al estado inmaduro de los mismos; (2) especies candidatas

confirmadas (CCS, Confirmed Candidate Species) las cuales presentan distancias genéticas no corregidas en el gen 16S rRNA >3%, aunque a veces sólo del 1-2%, con diferencias en las vocalizaciones y diferencias diagnósticas en al menos un carácter morfológico; y (3) linajes con-específicos profundos (DCL, Deep Conspecific Lineage) las cuales presentan distancias genéticas no corregidas en el gen 16S rRNA >3%, no presentan diferencia morfológicas y bioacústicas, aunque, a pesar de su solapamiento en la distribución geográfica con otras poblaciones, presenta haplotipos profundamente divergentes [48].

RESULTADOS

3.1 Análisis filogenéticos

Los resultados del análisis realizado en IQTree en términos del algoritmo MI demuestran que los modelos de mejor ajuste según BIC fueron: TPM2u+F+I+G4:COI1, TNe+G4:COI2, TN+F+I+G4:COI3, GTR+F+G4:16S, TIM2+F+G4:12S. A continuación, se presenta una lista de modelos de mejor ajuste por partición:

Tabla 1. Lista de modelos de mejor ajuste por partición. En donde AIC+ w-AIC son puntuaciones y ponderaciones del criterio de información de Akaike, AICc + w-AIC representan puntuaciones y ponderaciones AIC corregidas y BIC + w-BIC son puntuaciones y ponderaciones de los criterios de información bayesianos. Los signos + indican los conjuntos de confianza del 95% y los signos - indican una exclusión significativa.

ID	Modelo	LogL	AIC + w-AIC	AICc + w-AICc	BIC + w-BIC
1	TPM2u+F+I+G4	-2949.0516	5914.1032 + 0.0000	5914.7856 + 0.0000	5941.2522 + 0.0000
2	TNe+G4	-1875.3062	3758.6123 + 0.0000	3758.7975 + 0.0000	3772.2050 + 0.0000
3	TN+F+I+G4	-3828.555	7673.1100 + 0.0000	7673.7893 + 0.0000	7700.2953 + 0.0000
4	GTR+F+G4	-2719.8963	5459.7925 + 0.0000	5460.1792 + 0.0000	5503.4228 + 0.0000
5	TIM2+F+G4	-4168.5908	8353.1815 + 0.0000	8353.3480 + 0.0000	8391.3662 + 0.0000

Realizado por: Pasmai, 2024.

Por otra parte, se demuestran datos adicionales como: log-verosimilitud del árbol: -15414.4242 (se 481.2637), log-verosimilitud sin restricciones (sin árbol): -9097,1360, puntuación del criterio de información de Akaike (AIC): 31800.8485, puntuación del criterio de información de Akaike corregido (AICc): 32091,4341, puntuación del criterio de información bayesiano (BIC): 34550,2879, el árbol de consenso se construyó a partir de 1000 árboles Bootstrap, log-verosimilitud del árbol de consenso: -15414.444978, distancia de Robinson Foulds entre el árbol ML y el árbol de consenso: 18 y el mejor puntaje encontrado: -15414.424.

Los resultados más relevantes mostrados en la filogenia son (Fig. 3): (i) Se identifican nueve Clados bien soportados (UF=88.8, SH-aLRT= 99) en un grupo monofilético, entre los cuales se incluye el linaje de la población tipo de *Adenomera simonstuarti sensu stricto* (Clado 6) con un valor SH-aLRT de 98.5/100, (ii) Se identifican ocho Clados correspondientes a una especie candidata confirmada (Clado 9) con un valor SH-aLRT de 94.5 /99 y siete especies candidatas no confirmadas (Clados 1 al 5 y del Clado 7 al 8) con un valor SH-aLRT >80/>90 ; (iii) La especie candidata no confirmada (Clado 2) con un valor SH-aLRT de 100/100 y la especie candidata confirmada (Clado 9) incluyen las poblaciones provenientes de Ecuador, por lo que se descarta la presencia de *Adenomera andreae* o *Adenomera hylaedactyla* para nuestro país. Los valores SH-aLRT >80/>90 demuestran una confiabilidad fuerte del Clado mientras que los valores SH-aLRT <80/<90 indica una confiabilidad moderada y valores SH-aLRT <70/75< indican una confiabilidad débil.

Las nuevas secuencias colectadas en Ecuador con código único HMOA Y DHMECN (Figura 3A) se detallan en el Apéndice Tabla 1. Biogeográficamente, las poblaciones del Clado 2 están hacia el norte de la cuenca del río Napo, mientras las poblaciones del Clado 9 se localizan desde el lado sur de la cuenca del río Napo en Ecuador, hasta la Amazonía occidental en Perú y Brasil (Fig. 4). Por otra parte, las poblaciones de los linajes de los Clados 7 y 8, que son hermanos con el Clado 9 se distribuyen hacia las tierras bajas del río Amazonas, hacia la Amazonía central (Fig. 4). Las poblaciones de los Clados 3, 5 y 9 tienen distribuciones en simpatría, los Clados 2, 6 y 9 presentan una distribución peripátrica, mientras que los Clados 1, 2, 4, 6, 7, y 8 presentaron una distribución alopátrica entre sí (Fig. 4). Los linajes del Clado 2, Clado 9 y *Adenomera simonstuarti* son polifiléticos en este grupo monofilético (Fig. 3B).

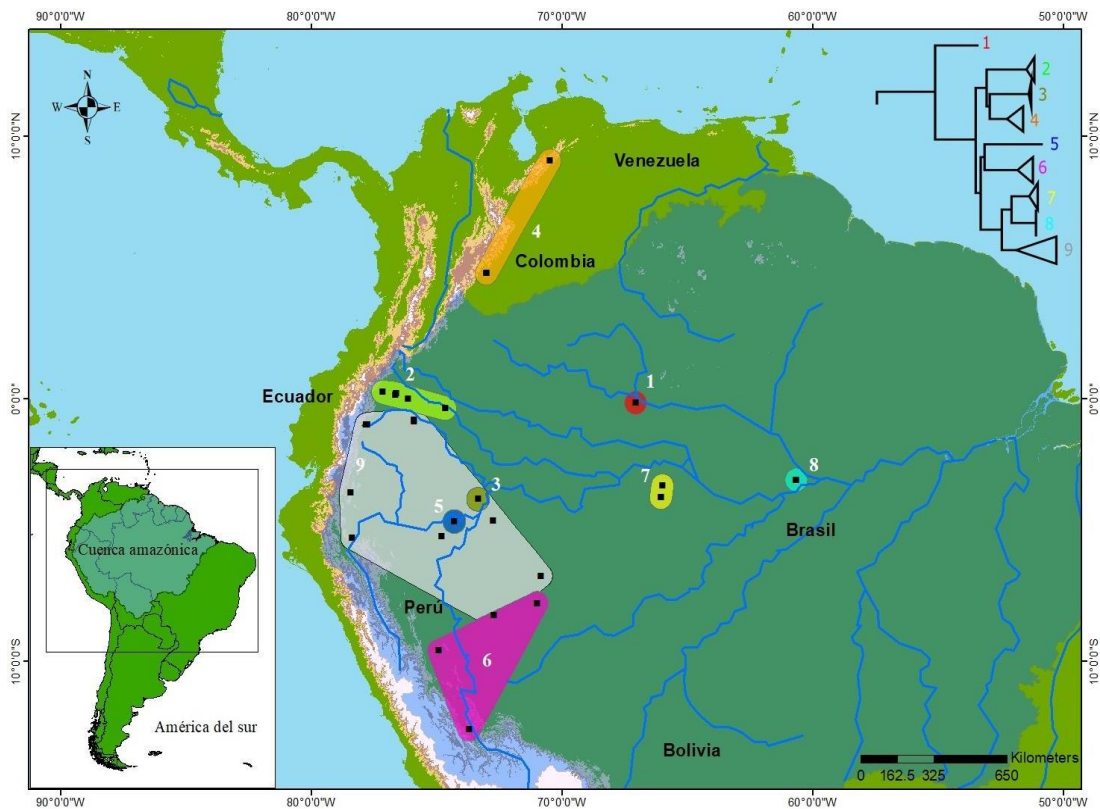


Figura 4. Distribución geográfica del complejo de especies en el Clado de *Adenomera simonstuarti sensu lato* en Sudamérica. El Clado 6 corresponde a la especie nominal *A. simonstuarti* y la población tipo [36]. Los números que se encuentran a un costado del árbol filogenético corresponden al número de Clado al cual corresponden. Los polígonos (buffer 50 km) representan las distribuciones de las poblaciones ubicadas por color en el árbol filogenético de la Figura 2.

Realizado por: Pasmai, 2024.

3.2 Distancias patrísticas

Las distancias patrísticas entre los Clados se detallan como promedio $\pm$ desviación estándar (SD) y el rango (min–max) en la Tabla 2. Respecto a las Clados que incluyen poblaciones ecuatorianas (Clado 2 y 9), los resultados mostraron que las distancias genéticas comparadas entre ellos y el linaje de *Adenomera simonstuarti sensu stricto* (Clado 6) fueron: Clados 2 y 9 variaron en un rango de 0.047 ± 0.004 (0.043-0.058), Clados 2 y 6 variaron 0.043 ± 0.003 (0.04-0.048), finalmente entre los Clados 6 y 9 variaron en un rango de 0.035 ± 0.004 (0.029-0.047)

Tabla 2. Distancias patrísticas de los genes 16S + 12S + COI del ADNmt. El color representa las distancias patrísticas entre Clados (2 y 9), que incluyen poblaciones ecuatorianas, y el Clado de *Adenomera simonstuarti sensu stricto* (Clado 6). Los valores se presentan como $X \pm SD(\text{min-max})$.

Clados	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0±0 (0-0)	0.057±0.001 (0.056-0.059)	0.057±0.001 (0.056-0.057)	0.052±0.002 (0.05-0.053)	0.057±0 (0.057-0.057)	0.049±0.003 (0.046-0.052)	0.054±0.002 (0.052-0.055)	0.055±0 (0.055-0.055)	0.052±0.004 (0.049-0.061)
2		0.001±0.002 (0-0.004)	0.035±0.001 (0.034-0.038)	0.031±0.002 (0.028-0.034)	0.052±0.001 (0.051-0.054)	0.043±0.003 (0.04-0.048)	0.049±0.002 (0.046-0.052)	0.05±0.001 (0.049-0.052)	0.047±0.004 (0.043-0.058)
3			0.001±0.001 (0.001-0.002)	0.028±0.001 (0.025-0.029)	0.052±0.001 (0.051-0.052)	0.043±0.002 (0.04-0.046)	0.049±0.001 (0.046-0.05)	0.05±0 (0.049-0.05)	0.047±0.004 (0.043-0.056)
4				0.005±0.004 (0-0.009)	0.047±0.002 (0.045-0.048)	0.039±0.003 (0.034-0.043)	0.045±0.002 (0.04-0.046)	0.045±0.001 (0.043-0.046)	0.042±0.004 (0.037-0.052)
5					0±0 (0-0)	0.037±0.003 (0.034-0.04)	0.045±0.002 (0.043-0.046)	0.046±0 (0.046-0.046)	0.043±0.004 (0.04-0.052)
6						0.005±0.002 (0.003-0.006)	0.037±0.003 (0.032-0.041)	0.038±0.003 (0.035-0.041)	0.035±0.004 (0.029-0.047)
7							0.002±0.002 (0-0.003)	0.018±0.001 (0.016-0.019)	0.021±0.004 (0.016-0.031)
8								0±0 (0-0)	0.022±0.004 (0.019-0.031)
9									0.008±0.006 (0-0.024)

Realizado por: Pasmai, 2024.

3.3 Análisis morfológico

Las comparaciones se presentan para los Clados 2 y 9 de los cuales se obtuvo datos morfológicos, mismos que se representan en Análisis de Componentes Principales en las Figuras 5 y 6.

Los machos no presentaron una separación morfológica entre los tres componentes principales (Figura 5). La mayor variación de datos en el primer componente principal (38.5%) se explica por la relación con longitud del pie + la longitud del tarso (FoL), mientras que la longitud del Pie (MeL) tiene una alta carga en el segundo componente con un 22.6% (Figura 5A). La carga del tercer componente es de 11.2% explicada por la correlación con la longitud del fémur (THL) (Figura 5B).

Las hembras no presentaron una separación morfológica entre los tres componentes principales (Figura 6). La mayor variación de datos en el primer componente principal (41.5%) se explica por la relación con longitud del pie + la longitud del tarso (FoL), mientras que la longitud del fémur (THL) tiene una alta carga en el segundo componente con un 22.2% (Figura 6C). La carga del tercer componente es de 14.7% explicada por la correlación con el ancho de la cabeza (HW) (Figura 6D).

Las diferencias estadísticas de los parámetros morfológicos entre las poblaciones de *Adenomera andreae*, *Adenomera hylaedactyla*, *Adenomera simonstuarti* y de las poblaciones del Clado 9 en machos y hembras se detallan en la Tabla 3. Entre *A. simonstuarti* y el muestreo realizado en las poblaciones ecuatorianas no existe diferencias significativas (Tabla 3). De manera general, existen diferencias significativas en algunas de las medidas morfométricas (i.e. SVL, EN, TD, etc., Tabla 2) entre los individuos machos de las poblaciones de *A. andreae sensu stricto* y *A. hylaedactyla sensu stricto* comparadas con las poblaciones del Clado 9 (Tabla 3). Sin embargo, los machos y las hembras de los Clados 2, 6 (*A. simonstuarti*) y 9 no presentaron diferencias significativas en su morfología (Tabla 3).

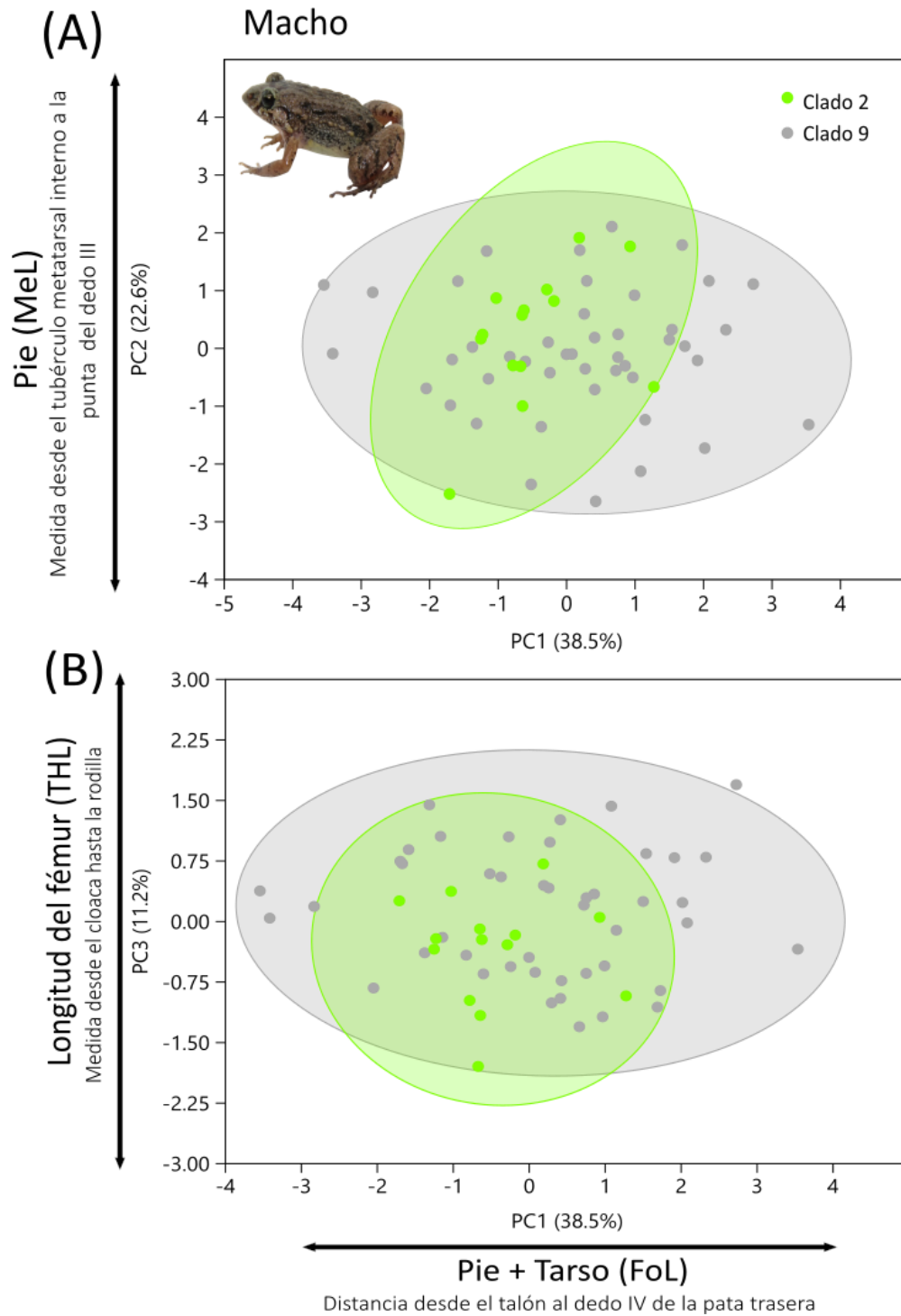


Figura 5. Especímenes evaluados por comparación de datos morfométricos de los Clados 2 y 9 mediante componentes principales en (A, B) machos de *Adenomera spp* localizados en la región amazónica ecuatoriana. Las variables morfométricas que mejor explicaron la varianza en los datos se muestran en consecuencia con cada eje.

Realizado por: Pasmai 2024.

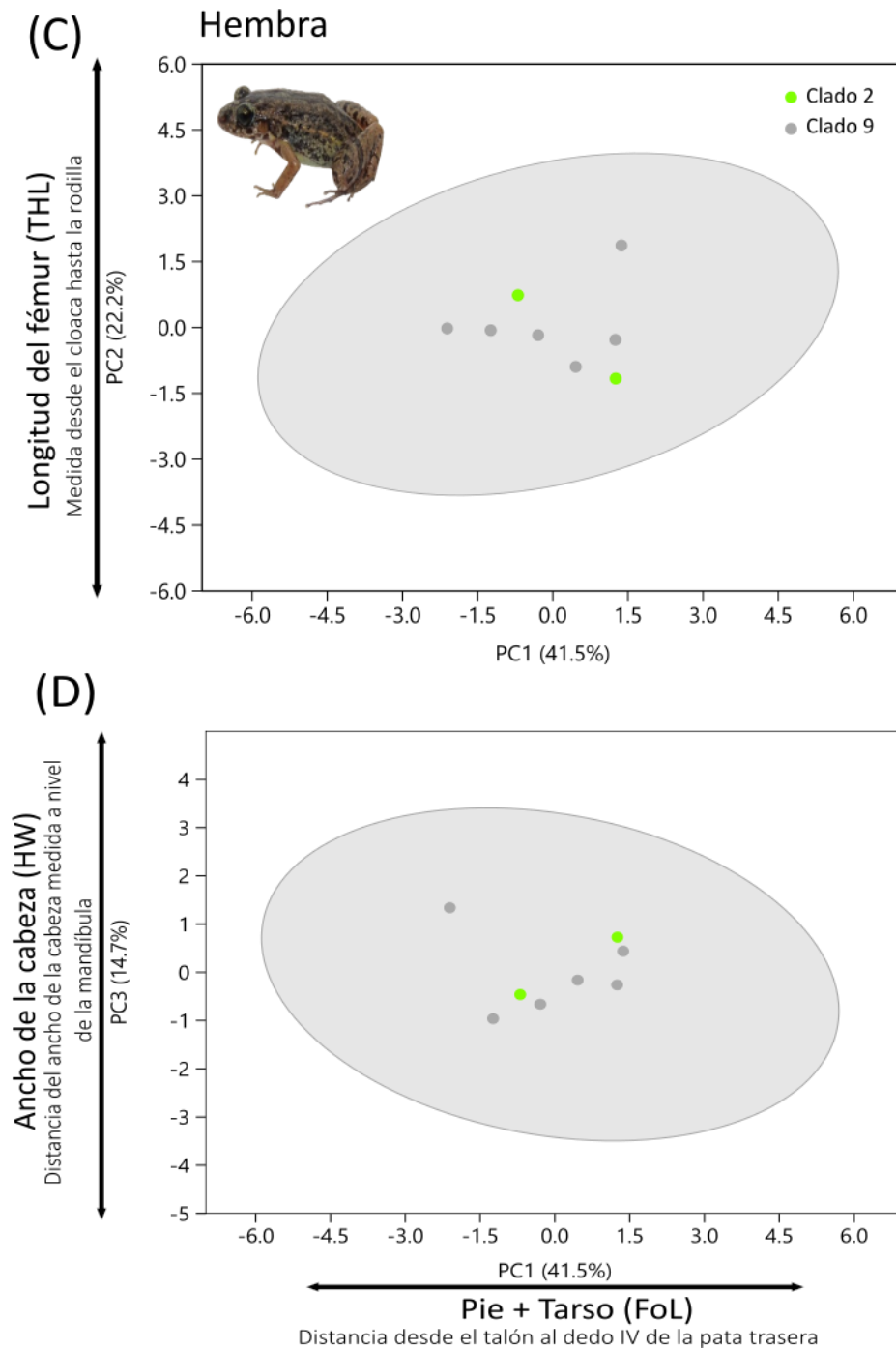


Figura 6. Especímenes evaluados por comparación de datos morfométricos de los Clados 2 y 9 mediante componentes principales en (C, D) hembras de *Adenomera spp.* localizados en la región amazónica ecuatoriana. Las variables morfométricas que mejor explicaron la varianza en los datos se muestran en consecuencia con cada eje.

Realizado por: Pasmai, 2024.

Tabla 3. Rasgos morfométricos (sólo machos adultos) de dos especies de *Adenomera* de la Amazonia brasileña y peruana, y del ecotono de la sabana guayanesa en el estado brasileño de Roraima (*A. andreae* y *A. hylaedactyla*) (véase Carvalho, 2019); dos especímenes machos tipo de *A. simonstuarti* de la localidad tipo Campamento Segakiato, río camisea, distrito de Echarate, provincia de la convención, región del Cusco, Perú y cuatro especímenes hembras (véase Angulo e Icochea, 2010). Los datos son presentados como promedio $\pm$ SD (min–max). Se incluyó dos linajes (Clado 2 y 9) relacionados geográfica y filogenéticamente con el linaje de *A. simonstuarti* (Clado 6) en Ecuador, con una serie de sesenta especímenes de machos adultos y ocho especímenes de hembras adultas. Los rasgos morfométricos se definen en Materiales y Métodos. * = Holotipo de *A. hylaedactyla* (ANSP2240). † = Diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al Clado 9 de Ecuador. ‡ = Diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al Clado 2 de Ecuador.

Linaje	<i>A. andreae</i>	<i>A. hylaedactyla</i>	<i>A. simonstuarti</i>	Clado 2	Clado 9	<i>A. simonstuarti</i>	Clado 2	Clado 9	
Sexo	Machos			Hembras					
Rasgo (mm) / Individuos (N)	25	1*	25	2	14	46	4	2	6
SVL	20.7 ±0.8 (19.3-23.0)†	24	24.0±1.1 (22.2-26.5)†	26.1±0.2 (25.9-26.2)	23.6±1 (21.6-25.5)	24±2.2 (19.2-29.7)	24 ±1.1 (23.2-25.2)	25.3±2.5 (23.5-27.1)	25.4±2.3 (21.7-27.8)
EN	1.8±0.2 (1.4-2.0)†	1.8	2.0±0.2 (1.6-2.3)†	2.0±0.1 (1.9-2.1)	2.2±0.3 (1.8-2.7)	2.3±0.4 (1.4-3.3)	2.2 ± 0.2 (1.9-2.4)	2.4±0.2 (2.3-2.6)	2.8±0.7 (2.3-3.9)
ED	2.0±0.2 (1.6-2.3)†	2.2	2.2±0.3 (1.7-2.8)	2.8±0.3 (2.6-3.0)	2.5±0.2 (2.3-2.9)	2.5±0.3 (1.8-3.1)	2.5 ± 0.1 (2.4-2.6)	2.9±0.2 (2.7-3)	2.7±0.1 (2.5-2.8)
TD	1.2±0.1 (1.0-1.4)†‡	1.4	1.3±0.1 (1.2-1.5)†‡	1.7 ± 0.0 (1.7–1.7)	1.5±0.2 (1.3-1.9)	1.6±0.2 (1.2-2.2)	1.7 ± 0.2 (1.5-1.9)	1.8±0.1 (1.7-1.9)	1.8±0.2 (1.6-2)
HAL	4.4±0.3 (4.0-5.1)†	4.7	5.3±0.3 (4.7-6.1)†	5.4 ± 0.0 (5.4–5.4)	4.9±0.4 (4.1-5.5)	5±0.6 (3.9-7.3)	5.2 ± 0.1 (5.1-5.4)	5.1±0.6 (4.7-5.6)	5.3±0.5 (4.6-5.9)
THL	9.6±0.4 (8.6-10.7)†‡	9.8	10.5±0.8 (9.0-12.1)	10.2±0.8 (9.6-10.7)	9.3±0.8 (8-11)	9.9±0.9 (7.9-12.8)	10.7 ± 0.4 (10.3-11.2)	9.4±0.3 (9.2-9.6)	9.8±1 (8.8-11.4)
TL	9.8±0.4 (9.3-10.7)†	11	10.9±0.7 (9.8-12.5)†	11.2±0.6 (10.8-11.6)	11.3±0.5 (10.6-12.4)	11.8±1.1 (9.3-15.1)	11.3 ± 0.4 (10.9–11.7)	12.3±1.2 (11.4-13.1)	11.8±0.6 (10.9-12.7)
FoL	10.3±0.4 (9.4-11.2)†‡	11	12.3±0.7 (11.3-13.6)†	11.7±0.8 (11.1-12.2)	15.9±0.7 (14.8-17.7)	16.7±1.9 (11.7-23.3)	11.5 ± 0.5 (10.9-12.2)	17.8±2.1 (16.4-19.3)	17.2±0.9 (16.1-18.2)

Fuentes: Carvalho *et al.* [15], Angulo & Icochea *et al.* [24].

Realizado por: Pasmai, 2024.

3.4 Análisis bioacústico

Tabla 4. Medición de los parámetros acústicos de las vocalizaciones del holotipo de *Adenomera simonstuarti* (véase Angulo e Icochea, 2010) e individuos del Clado 9 provenientes de Ecuador. Los datos se presentan como $X \pm SD(\text{min-max})$. Entre los parámetros acústicos comparados para las dos especies existen diferencias significativas (F and T tests; $P < 0.05$). Las definiciones de parámetros acústicos pueden observarse en (Apéndice, Tabla 2). *= Holotipo de *A. simontuarti*.

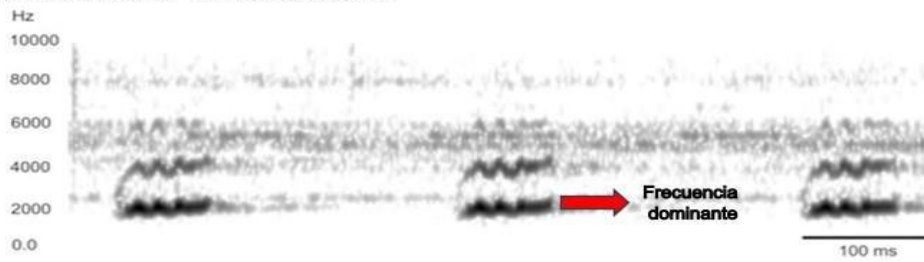
Linajes	<i>Adenomera simonstuarti</i>	<i>Adenomera sp. (Clado 9)</i>
Etiqueta de grabaciones	MHNSM 18218	HMOA 2573, 2574,2575,2576,2577 y QCAZA51254
Número de grabaciones analizadas	62*	6
Parámetros acústicos		
Longitud de canto (ms)	65.3 $\pm$ 3.7(57.1–71.4)	112.3 $\pm$ 72.9(66.2-415.3)
Tiempo del pico de la vocalización (ms)	13.6 $\pm$ 6.8(4.8–44.8)	33.2 $\pm$ 22.5(8.4-126.5)
Tasa de vocalización (cantos/minutos)	231(216–246)	81(3-23)
Frecuencia fundamental (HZ) (1 armónica)	1962.7 $\pm$ 43.7 (1813.2-2034.8)	2056.3 $\pm$ 67.8(800-3184.8)
Frecuencia armónica 2 (HZ)	3892.8 $\pm$ 86.9 (3707-4049.5)	4205 $\pm$ 135.9 (2829.3-5333.3)
Frecuencia armónica 3 (HZ)	5773.4 $\pm$ 213.4 (4956-6023.8)	6136.3 $\pm$ 247.2 (4610.8-7566.5)
Frecuencia dominante	1962.7 $\pm$ 43.7 (1813.2-2034.8)	4175 $\pm$ 282.6(2062.5-4500)
Cambio en la frecuencia dominante (Hz)	298 $\pm$ 63.7(170.9-430)	1638.1 $\pm$ 284.3 (933.3-2341.5)
Número total de armónicos detectados por grabación	3	7

Fuente: Angulo & Icochea *et al.* [24].

Realizado por: Pasmai, 2024.

El holotipo *Adenomera simonstuarti* MHNSM 18218 tiene una duración de canto de 57.1–71.4 ms que se repite a un ritmo elevado de 231 cantos/min (Tabla 4) en donde el tiempo del pico de la vocalización es de 4.8–44.8 ms (Tabla 4). Éste, tiene 3 a 4 pulsos con fuertes modulaciones de amplitud en el canto (Figura 7A). En este caso la frecuencia dominante es la frecuencia fundamental (1813.2–2034.8 Hz), las vocalizaciones tienen dos frecuencias adicionales relacionadas armónicamente a 3707–4049.5 Hz y 4956–6023.8 Hz de menor intensidad que la fundamental. Por otra parte, las grabaciones de poblaciones del Clado 9 tienen una mayor duración de canto de 66.2–415.3 ms que se repite a un ritmo elevado de 81 cantos/min, (Tabla 4) en donde el tiempo del pico de la vocalización es de 8.4–126.5 ms (Tabla 4). Éstas, tienen de 7 a 12 pulsos con leves modulaciones de amplitud en el canto (Figura 7B). La frecuencia dominante fue de entre 2062.5–4500 Hz, y las vocalizaciones tienen tres frecuencias adicionales relacionadas armónicamente a 800–3184.8 Hz, 2829.3–5333.3 Hz y 4610.8–7566.5 Hz, respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico F and T tests hay diferencias significativas entre *Adenomera simonstuarti* y las poblaciones del Clado 9 en todos los parámetros acústicos (Tabla 4).

(A) *Adenomera simonstuarti*



(B) *Adenomera sp. nov.*

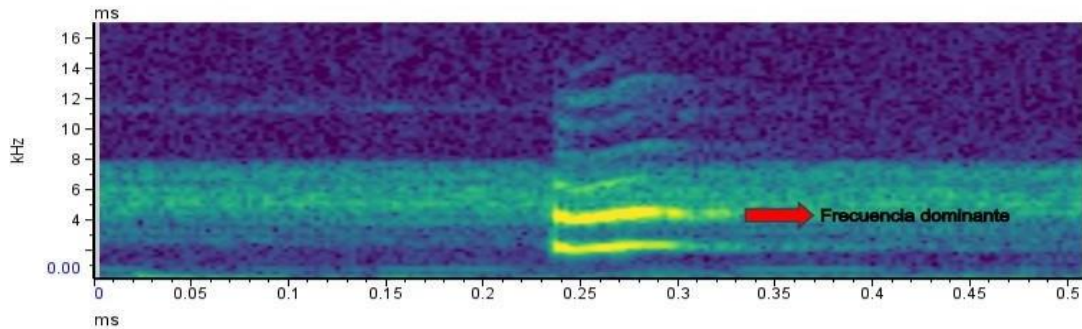


Figura 7. Espectrograma del holotipo MHNSM 18218 *Adenomera simonstuarti*, fue grabado a las 18:20 h del 11 de octubre de 1997 a una temperatura ambiente de 27 °C, debajo de la hojarasca junto a un tronco podrido [24]. Se muestra una llamada caracterizada por tres notas pulsadas y una fuerte modulación de los kHz. (B) Espectrograma de un espécimen macho de la población del Tena *Adenomera sp.* (Clado 9), grabada a las 19:46 h del 22 de marzo 2023 a una temperatura de 26°C, en pastizal seco. Se muestra una llamada caracterizada por siete notas pulsadas y una modulación con un incremento leve visible de los kHz.

Realizado por: Pasmai, 2024.

3.5 Análisis biogeográfico

La variable biogeográficamente más importante fue la precipitación anual (BIO12) entre las poblaciones de *Adenomera spp.*, provenientes de Ecuador (Fig. 8). De toda la variación de los datos analizados, el 95% está explicado por precipitación anual en el primer Componente Principal, mientras que la precipitación del trimestre más explica solo un 4% en el segundo Componente Principal (Fig. 8A). Las poblaciones del Clado 9 es la que mayor amplitud en la variación presentó entre los tres Componentes Principales (Fig. 8).

La mayor variación en la precipitación media anual (BIO12) se registran en Clados 2,4,6,7 y 9 (Fig. 8B y C). El Clado 2, cuyas poblaciones incluyen algunas de Ecuador refleja mayor

concentración de datos a los 3250 mm; el Clado 4 a los 2500 mm; el Clado 6 a los 2000 mm; el Clado 7 a los 3000 mm y el Clado 9 a los 4000 mm. Los Clados 1,3,5 y 8 presentaron la menor variación de los datos (Fig. 8C).

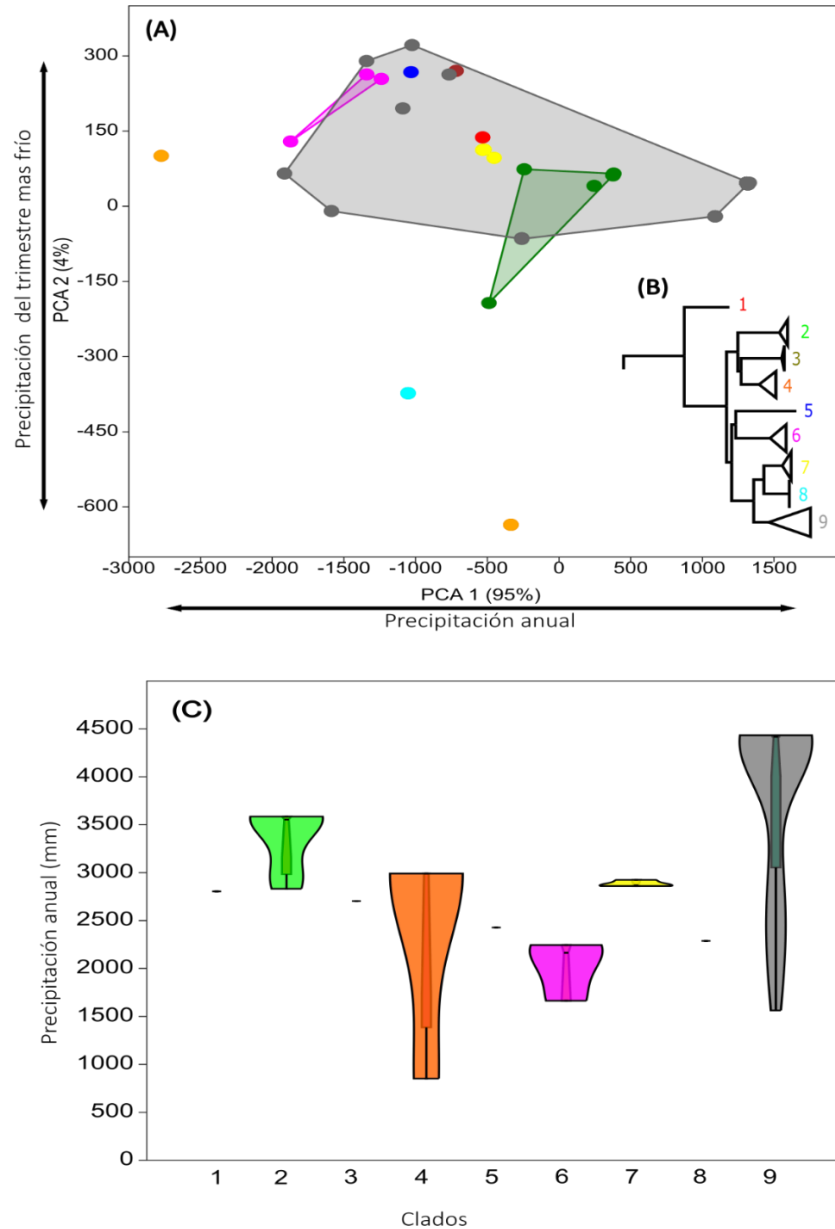


Figura 8. (A) Relaciones entre las variables climáticas mediante componentes principales en los linajes del Clado de *A. simonstuarti* sensu lato (B). Estructura del árbol filogenético presentado en el mapa geográfico de la Figura 3, y (C) Gráfica de caja y violines mostrada por Clados para representar la variación en la precipitación anual (BIO12, mm). Cada Clado presente en la filogenia (B) tiene un número y color asociado a la gráfica de variables climáticas (A y C).

Realizado por: Pasmai, 2024.

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó y exploró la diversidad críptica en poblaciones de ranas del género *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) en Sudamérica, mismas que incluyen nuevas secuencias de poblaciones provenientes de Ecuador. Las evidencias filogenéticas, biogeográficas, bioacústicas y morfologías presentadas destacan que *A. andreae* y *A. hylaedactyla* no forman parte de la batracofauna de Ecuador, que es acorde a lo propuesto por Carvalho [36].

El análisis filogenético resultó en que las poblaciones ecuatorianas se ubicaron dentro del linaje de *A. simonstuarti sensu stricto*, con ocho linajes adicionales. De esta manera, se hipotetiza la presencia de al menos 7 linajes que se identifican como especies candidatas no confirmadas [48] y un linaje (Clado 9) que identificamos como una especie candidata confirmada [48] (Fig. 3 y 4). De esta manera, se corrobora que el grupo que incluye a *A. simonstuarti sensu stricto* es un complejo de especies distribuidas en la Amazonía [36].

Las poblaciones ecuatorianas, sorprendentemente resultaron en dos Clados no relacionados filogenéticamente de manera directa dentro del grupo, correspondientes al Clado 2 y 9 (Fig. 3A). Las muestras de Ecuador junto con las muestras genéticas con código LSU-12840 Y MHNC6302 (Fig. 1 y 2) de Carvalho y colaboradores [36] se encuentran relacionadas filogenética (Fig. 3A) y geográficamente (Fig. 4) dentro del Clado 2. Se puede evidenciar en la Figura 3A que el linaje perteneciente al Clado 2 es linaje hermano con los Clados 3, 4 y 5, con una distribución hacia el norte del río Napo en Ecuador de esta manera, se considera al Clado 2 una especie candidata no confirmada debido a la falta de información morfológica y bioacústica de sus poblaciones véase en la Tabla 1 del estudio de Veites *et al.* [48].

Por otro lado, las muestras genéticas con código AJC-2777, MHNC-10092, LSU-13787, PEP-515 y QU-2965 (Fig. 1 y 2) obtenidas en el estudio de Carvalho y colaboradores [36],

en conjunto con las muestras obtenidas en Ecuador se encuentran relacionadas filogenéticamente (Fig. 3A) y geográficamente (Fig. 4) dentro del Clado 9. Este linaje está emparentado filogenéticamente con los Clados 7 y 8 (Fig. 3A). Considero al Clado 9 como una especie candidata confirmada en base a evidencia morfológica, biocústica y genética presentada en este trabajo véase en la Tabla 1 del trabajo de Veites *et al.* [48].

Biogeográficamente las poblaciones del Clado 2 se distribuyen desde la cuenca de río Napo hacia el norte llegando hasta el extremo norte de Perú, mientras que el Clado 9 desde el límite del río Napo hasta la Amazonía central de Perú y el occidente de Brasil (Fig. 4). Estos patrones biogeográficos se parecen a los patrones de distribución reportados en el estudio de Carvalho *et al.* [36] ubicados en las tierras bajas de la Amazonía del noreste de Ecuador y extremo norte de Perú para el linaje 4. Cabe destacar que en ese trabajo se reporta únicamente el linaje del norte de Ecuador, que corresponde al Clado 2 en nuestro estudio.

Si bien los análisis multivariados y paramétricos no muestran una separación morfológica entre los linajes de los Clados 2 y 9 (Fig. 3A), encontramos altas diferencias en distancias genéticas entre los linajes del grupo de *A. simonstuarti* (Fig. 3A) (Tabla 2). Este patrón de crípsis, donde existen diferencias filogenéticas y genéticas, pero baja diferenciación morfológica es recurrente en linajes considerados como complejos taxonómicos que se sospechan son especies crípticas [13–16,56–60].

Adenomera simonstuarti sensu stricto junto con los Clados 2 y 9 no pueden ser diferenciadas morfológicamente (Fig. 5 y 6) (Tabla 3), esto puede deberse a su cercanía filogenética y a la retención de caracteres morfológicos de su ancestro. La misma situación ocurre con *Adenomera andreae* y *Adenomera hylaedactyla*. El estudio de Carvalho *et al.* [15] reporta la difícil situación de diferenciar estas dos especies de manera morfológica ya que perdura el conservadurismo de caracteres entre estos grupos y las malas condiciones de preservación del holotipo. Las poblaciones correspondientes a los Clados ecuatorianos se diferencian de *Adenomera andreae* y *Adenomera hylaedactyla* en algunos caracteres morfométricos (Tabla 3). Esta similitud

demuestra predominancia y retención de caracteres ancestrales, a pesar de ser especies diferentes.

Los patrones acústicos son indicadores para la identificación de especies, por lo que el análisis de las vocalizaciones, junto con otras líneas de evidencia son necesarios para reconocer especies no descritas [14,36]. Los patrones acústicos más notables que permiten separar especies de *Adenomera* son las frecuencias, duración de la nota y número de pulsos [13–15,24,36]. Angulo y Icochea [24] proporcionaron datos de algunos parámetros acústicos clave para miembros del grupo que incluye a *Adenomera simonstuarti sensu stricto*. Una de las diferencias más notable de la vocalización de *Adenomera simonstuarti* es que la frecuencia dominante, se ubica en la primera armónica (=frecuencia fundamental), siendo más baja (1962.7 ± 43.7 Hz) en comparación con la frecuencia dominante ubicada en segunda armónica registrada en poblaciones ecuatorianas del Clado 9 (4175 ± 282.6 Hz) (Fig. 7).

Se ha observado una fuerte ocupación de la Amazonía, con el surgimiento de áreas urbanas, ocasionando un aumento de las presiones antropogénicas sobre sus recursos de flora y fauna [61]. Actualmente dentro de estas áreas antropogénicas se mantiene un pequeño recurso denominado áreas verdes, que son de gran importancia para la supervivencia de organismos como aves, pequeños mamíferos, insectos, anfibios y reptiles [62]. Las poblaciones documentadas en los alrededores de la ciudad del Tena, Napo, Ecuador, son comúnmente registradas en áreas urbanas con vegetación remanente en parques o terrenos baldíos, bosques secundarios, bancos de ríos y riachuelos, borde de bosque y claros agrícolas, similares a los hábitats reportados para *Adenomera hylaedactyla* [23,26,28,63]. Los linajes del Clado 2 y Clado 9 provenientes de Ecuador lograron al parecer, ser resilientes a vivir en zonas urbanizadas.

CONCLUSIONES

En este estudio se contribuyó a la comprensión taxonómica sobre los límites de especies de ranas *Adenomera* provenientes de Ecuador. Primero, descartamos la presencia de *Adenomera andreae* y *Adenomera hylaedactyla* para Ecuador; también se reporta una alta diversidad críptica en el grupo de *A. simonstuarti*, con al menos 9 linajes en la Amazonía. Entre los linajes estudiados con poblaciones ecuatorianas, el Clado 2 representa una especie candidata no confirmada, mientras que el Clado 9 es una especie candidata confirmada relacionadas con el grupo de *A. simonstuarti* en la Amazonía.

REFERENCIA

1. Hoorn C, Wesselingh FP, Ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, et al. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* (1979). 2010;330: 927–931. doi:10.1126/science.1194585
2. Gatti L V., Basso LS, Miller JB, Gloor M, Gatti Domingues L, Cassol HLG, et al. Amazonia as a carbon source linked to deforestation and climate change. *Nature* 2021 595:7867. 2021;595: 388–393. doi:10.1038/s41586-021-03629-6
3. Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, Da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000 403:6772. 2000;403: 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
4. Dixon J, P. Soini. The reptiles of the upper Amazon basin, Iquitos, Peru. Millwakee Public Museum. 1975.
5. Duellman WE, Mendelson JR. Amphibians and reptiles from northern Departamento Loreto, Peru: Taxonomy and biogeography. *University of Kansas science bulletin*. 1995;55: 329–376.
6. Lynch J. Discovery of the richest frog fauna in the world-an exploration of the forests to the north of Leticia. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat*. 2005;29: 581–588.
7. Vigle GO. The Amphibians and Reptiles of the Estación Biológica Jatun Sacha in the Lowland Rainforest of Amazonian Ecuador: A 20-Year Record. *Breviora*. 2008;514: 1–30. <https://doi.org/10.3099/0006-9698-514.1.1>
8. Santos JC, Coloma LA, Summers K, Caldwell JP, Ree R, Cannatella DC. Amazonian Amphibian Diversity Is Primarily Derived from Late Miocene Andean Lineages. *PLOS Biol*. 2009;7: e1000056. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000056>
9. Bass MS, Finer M, Jenkins CN, Kreft H, Cisneros-Heredia DF, McCracken SF, et al. Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLOS One*. 2010;5: e8767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008767>
10. Laurance WF, Albernaz AKM, Fearnside PM, Vasconcelos HL, Ferreira L V. Deforestation in Amazonia. *Science* (1979). 2004;304: 1109–1111. doi:10.1126/SCIENCE.304.5674.1109B
11. Antonelli A, Quijada-Mascareñas A, Crawford AJ, Bates JM, Velazco PM, Wüster W. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. *Amazonia, landscape and species evolution: A look into the Past*. 2010; 386–404. doi:10.1002/9781444306408.CH24
12. Ron SR, Merino-Viteri A, Ortiz DA. Anfíbios del Ecuador. Version 2024.0. In: Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador [Internet]. 2024 [cited 2 Jun 2024]. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
13. Carvalho TR, Angulo A, Barrera DA, Aguilar C, Haddad FB. Hiding in Plain Sight: A Fourth New Cryptic Species of the *Adenomera andreae* Clade (Anura: Leptodactylidae) from Southwestern Amazonia. *Herpetologica*. 2020;76: 304–314. doi:10.1655/Herpetologica-D-19-00068.1
14. Carvalho TR, Angulo Ariadne, Kokubum MNC, Barrera DA, De Souza MB, Haddad CFB, et al. A New Cryptic Species of the *Adenomera andreae* Clade from Southwestern Amazonia (Anura, Leptodactylidae). *Herpetologica*. 2019;75: 233–246. doi:10.1655/D-18-00049
15. Carvalho TR, Giaretta AA, Maciel NM, Barrera DA, Aguilar-Puntriano C, Haddad CFB, et al. On the Uncertain Taxonomic Identity of *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868) and the Composite Type

- Series of *A. andreae* (Müller, 1923) (Anura, Leptodactylidae). *Copeia*. 2019;107: 708–723. doi:10.1643/CH-19-237
16. Ortega-Andrade HMauricio, Deichmann JL, Chaparro JC. Two New Cryptic *Pristimantis* (Anura, Craugastoridae) from the Southern Amazon Basin of Peru with Taxonomic Comments on *Pristimantis imitatrix* (Duellman, 1978). *South American J of Herpetology*. 2021;21: 41–64. doi:10.2994/SAJH-D-17-00068.1
 17. Székely P, Eguiguren JS, Ordóñez-Delgado L, Armijos-Ojeda D, Székely D. Fifty years after: A taxonomic revision of the amphibian species from the Ecuadorian biodiversity hotspot Abra de Zamora, with description of two new *Pristimantis* species. *PLOS One*. 2020;15: e0238306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238306>
 18. Queiroz K. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst Biol*. 2007;56: 879–886. doi:10.1080/10635150701701083
 19. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*. 2007;22: 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
 20. Padial Fregenal JM. Taxonomía integrativa de las especies de *Eleutherodactylus* y *Oreobates* de Bolivia (Amphibia: Anura). 2007 [cited 19 Apr 2023]. Available: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/1567>
 21. Dayrat B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2005;85: 407–417. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
 22. Moraes LJCL, Werneck FP, RCrossed D Sign@jaud A, Rodrigues MT, Prates I, Glaw F, et al. Diversification of tiny toads (Bufonidae: Amazophrynella) sheds light on ancient landscape dynamism in Amazonia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2022;136: 75–91. doi:10.1093/BIOLINNEAN/BLAC006
 23. IUCN. The IUCN red list of threatened species. Version 2023-1. 2023 [cited 23 Jun 2024]. Available: <https://www.iucnredlist.org>
 24. Angulo A, Icochea J. Cryptic species complexes, widespread species and conservation: lessons from Amazonian frogs of the *Leptodactylus marmoratus* group (Anura: Leptodactylidae). *Syst Biodivers*. 2010;8: 357–370. doi:10.1080/14772000.2010.507264
 25. Cope ED. An examination of the Reptilia and Batrachia obtained by the Orton Expedition to Equator and the Upper Amazon, with notes on other species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 1868;20: 96–140. Available: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/27233>
 26. Sanches P, Santos F, Costa C. Diet of *Adenomera hylaedactyla* (Cope, 1868) (Anura: Leptodactylidae) from an urban area in southern Amapá, eastern Amazon. *Herpetol Notes*. 2019;12: 841–845. Available: <https://www.biotaxa.org/hn/article/view/38501>
 27. Müller L. Neue oder seltene Reptilien und Batrachier der zoologischen Sammlung des bayerischen Staates. *Zool Anz*. 1923;57: 38–42.
 28. Frost DR. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.2 (Date of access). In: American Museum of Natural History, New York, USA [Internet]. 2023 [cited 6 Feb 2023]. doi.org/10.5531/db.vz.0001
 29. Heyer WRonald. Systematics of the Marmoratus group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Contributions in Science*. 1973; 1–50.
 30. AmphibiaWeb. Universidad de California, Berkeley, CA, EE. UU. 2024 [cited 19 Apr 2024]. Available: <https://amphibiaweb.org>

31. Heyer WRonald. Relationships of the *Marmoratus* species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. Contributions in Science: Natural History Museum, Los Angeles County. 1974;253: 1–45.
32. Angulo A, Cocroft RB, Reichle S. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Perú. 2003;59: 490–504. <https://doi.org/10.1655/20-104>
33. Fouquet A, Santana Cassini C, Fernando Baptista Haddad C, Pech N, Trefaut Rodrigues M. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). J Biogeogr. 2014;41: 855–870. doi:10.1111/JBI.12250
34. Ministerio del ambiente. Sistema de clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. 2013.
35. Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [Internet]. In: Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE.UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica [Internet]. 1988 [cited 23 Jun 2024]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
36. Carvalho TR, Moraes LJ, Angulo A, Werneck FP, Icochea Javier, Lima AP. New acoustic and molecular data shed light on the poorly known Amazonian frog *Adenomera simonstuarti* (Leptodactylidae): implications for distribution and conservation. Eur J Taxon. 2020;2020: 1–18. doi:10.5852/EJT.2020.682
37. Crump, M.L And Scott,N.J, Jr, 1994. Visual encounter survey.In: Heyer, W.R.Donnely, MA; McDiarmid, R.W, Donnelly, Heyek, L.C, and Foster, M.S.(Eds) Measuring and monitoring biological diversity, standard methods for amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington D.C: pp 84-91. [cited 26 Jul 2024]. Available: <https://www.sciepub.com/reference/70556>
38. McDiarmid R. 1994. Preparing amphibians as scientific specimens. Pp. 289–296, in Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmid R.W., Hayek L.C., Foster M.S. (Eds.), Measuring and monitoring biological diversity standard methods for amphibians. Smithsonian Books, Washington D.C.
39. Vences M, Thomas M, Van Der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Front Zool. 2005;2: 1–12. doi:10.1186/1742-9994-2-5/FIGURES/5
40. Heinicke MP, Duellman WE, Hedges SB. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104: 10092–10097. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611051104>
41. Drummond A, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Heled J, et al. Geneious, Version 5.3. 2010 [cited 2 Feb 2023]. Available: <https://www.geneious.com/>
42. Maddison WP, D.R. Maddison. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.81. 2023 [cited 23 Jun 2024]. Available: <http://www.mesquiteproject.org>
43. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermini LS. Model Finder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nature Methods 2017 14:6. 2017;14: 587–589. doi:10.1038/nmeth.4285
44. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. Mol Biol Evol. 2015;32: 268–274. doi:10.1093/MOLBEV/MSU300
45. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. Syst Biol. 2010;59: 307–321. doi:10.1093/SYSBIO/SYQ010
46. Minh BQ, Nguyen MAT, Von Haeseler A. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. Mol Biol Evol. 2013;30: 1188–1195. doi:10.1093/MOLBEV/MST024

47. Rambaut A. FigTree v1.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. 2010 [cited 20 Apr 2023]. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
48. Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106: 8267–8272. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810821106>
49. Hammer DAT, Ryan PD, Hammer O, Harper DAT. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4: 178. Available: http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
50. Cocroft RB, Ryan MJ. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Anim Behav*. 1995;49: 283–303. doi:10.1006/ANBE.1995.0043
51. Lips K, Reaser J, Young B. El monitoreo de anfibios en América Latina. The nature conservancy. 1999.
52. Ocenaudio. [cited 19 Apr 2024]. Available: <https://www.ocenaudio.com/>
53. Raven Pro 1.6 – Cornell Lab of Ornithology Store. [cited 19 Apr 2024]. Available: <https://store.birds.cornell.edu/products/raven-pro-1-6-us-only>
54. Fick SE, Hijmans RJ. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 2017;37: 4302–4315. doi:10.1002/JOC.5086
55. QGIS.org. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. 2022. Available: <http://www.qgis.org>
56. Páez NB, Ron SR. Systematics of *Huicundomantis*, a new subgenus of *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) with extraordinary cryptic diversity and eleven new species. *ZooKeys* 868: 1–112. 2019;868: 1–112. doi:10.3897/ZOOKEYS.868.26766
57. Ortega-Andrade HM, Venegas PJ. A new synonym for *Pristimantis luscombei* (Duellman and Mendelson 1995) and the description of a new species of *Pristimantis* from the upper Amazon basin (Amphibia: Craugastoridae). *Zootaxa*. 2014;3895: 31–57–31–57. doi:10.11646/ZOOTAXA.3895.1.2
58. Rodríguez A, Dugo-Cota Á, Montero-Mendieta S, Gonzalez-Voyer A, Bosch RA, Vences M, et al. Cryptic within cryptic: genetics, morphometrics, and bioacoustics delimitate a new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae) from Eastern Cuba. *Zootaxa*. 2017;4221: 501–552–501–552. doi:10.11646/ZOOTAXA.4221.5.1
59. Rojas RR, Fouquet A, Ron SR, Hernández-Ruz EJ, Melo-Sampaio PR, Chaparro JC, et al. A Pan-Amazonian species delimitation: High species diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae). *PeerJ*. 2018;2018: e4941. doi:10.7717/PEERJ.4941/SUPP-9
60. Ortega-Andrade HM, Rojas-Soto OR, Monteros AE de los, Valencia JH, Read M, Ron SR. Revalidation of *Pristimantis brevicrus* (Anura, Craugastoridae) with taxonomic comments on a widespread Amazonian direct developing frog. *Herpetological Journal*. 2017;27: 81–97. Available: <https://www.thebhs.org/publications/the-herpetological-journal/volume-27-number-1-january-2017/952-10-revalidation-of-i-pristimantis-brevicrus-i-anura-craugastoridae-with-taxonomic-comments-on-a-widespread-amazonian-direct-developing-frog>
61. Pulido Capurro V, Málaga Arenas E, Olivera Carhuaz E, Acevedo Flores J. Conservación de hábitats y aves en el Santuario Nacional de las Lagunas de Mejía, Arequipa, Perú. *Arnaldoa*. 2021;28: 183–198.
62. Suárez González LF. Reptiles y anfibios como bioindicadores para implementar en estudios de impacto ambiental y planes de manejo ambiental. Universidad Militar Nueva Granada. 2017 [cited 23 Jun 2024]. Available: <http://hdl.handle.net/10654/16470>

63. Lima A, Magnusson W, Menin M, Erdtmann L, Rodrigues D de J, Keller C, et al. Guia de Sapos da Reserva Adolpho Ducke - Amazonia Central. 2012 [cited 7 Jan 2023]. Available: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/36309>

APÉNDICES

Tabla 1. En esta tabla incluimos a los especímenes utilizados para análisis morfológicos. Para cada individuo: número de museo, nombre de la especie, localidad, coordenadas, elevación y sexo. Los especímenes examinados fueron capturados en Ecuador.

Número de museo	Especie	Localidad	Altitud	Latitud	Longitud	Sexo	Material examinado
HMOA 2555	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía ministerio del ambiente diagonal a la escuela nacional Tena	557	-0.98164	-77.81485	F	Material examinado en colección
HMOA 2556	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía ministerio del ambiente diagonal a la escuela nacional Tena	540	-0.98164	-77.81486	F	Material examinado en colección
HMOA 2566	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio la unión frente a la cancha cubierta	548	-0.9977157	-77.8066511	F	Material examinado en colección
DHMECN 4694	<i>Adenomera sp 9</i>	Rio Tigre, Balsaura	186	-1.947314	-76.261642	F	Material examinado en colección
DHMECN 4369	<i>Adenomera sp 9</i>	Montalvo (Andoas), Nuevo Corrientes, Kurintza	300	-2.074918	-76.754991	F	Material examinado en colección
DHMECN 5377	<i>Adenomera sp 9</i>	Río negro, Zuñac	1440	-1.40101	-78.186776	F	Material examinado en colección
HMOA 2553	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía ministerio del ambiente diagonal a la escuela nacional Tena	541	-0.98173	-77.81474	M	Material examinado en colección
HMOA 2554	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía ministerio del ambiente diagonal a la escuela nacional Tena	543	-0.98172	-77.81473	M	Material examinado en colección

HMOA 2558	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio las Palmas a unas cuerdas del parque lineal	510	-0.98379	-77.82375	M	Material examinado en colección
HMOA 2559	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio las Palmas a unas cuerdas del parque lineal	556	-0.98722	-77.81793	M	Material examinado en colección
HMOA 2560	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio las Palmas a unas cuerdas del parque lineal	546	-0.98716	-77.81848	M	Material examinado en colección
HMOA 2562	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio las Palmas a unas cuerdas del parque lineal	525	-0.98705	-77.81839	M	Material examinado en colección
HMOA 2564	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio la unión frente a la cancha cubierta	501	-0.9978303	- 77.8067246	M	Material examinado en colección
HMOA 2567	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio la unión frente a la cancha cubierta	548	-0.9977914	- 77.8067801	M	Material examinado en colección
HMOA 2568	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio la unión frente a la cancha cubierta	548	-0.9979575	- 77.8066517	M	Material examinado en colección
HMOA 2573	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía al ministerio del ambiente	539	-0.9826318	- 77.8137252	M	Material examinado en colección
HMOA 2574	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía al ministerio del ambiente	539	-0.9825659	- 77.8137187	M	Material examinado en colección
HMOA 2575	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía al ministerio del ambiente	514	-0.9837035	-77.813835	M	Material examinado en colección
HMOA 2576	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía al ministerio del ambiente	536	-0.9832764	- 77.8133498	M	Material examinado en colección

HMOA 2577	<i>Adenomera sp 9</i>	Barrio Jumandy, vía al ministerio del ambiente	547	-0.9818493	-77.8145387	M	Material examinado en colección
DHMECN 13546	<i>Adenomera sp 9</i>	El Pangui, ECSA	827	-3.589379	-78.467187	M	Material examinado en colección
DHMECN 13547	<i>Adenomera sp 9</i>	El Pangui, ECSA	854	-3.594283	-78.465798	M	Material examinado en colección
DHMECN 13548	<i>Adenomera sp 9</i>	El Pangui, ECSA	943	-3.602068	-78.460415	M	Material examinado en colección
DHMECN 9069	<i>Adenomera sp 9</i>	El eden lodge	250	-0.524181	-76.123183	M	Material examinado en colección
DHMECN 1599	<i>Adenomera sp 9</i>	Puerto misahuallí, estación biológica Jatun Sacha	400	-1.049999	-77.716671	M	Material examinado en colección
DHMECN 1601	<i>Adenomera sp 9</i>	Puerto misahuallí, estación biológica Jatun Sacha	400	-1.049999	-77.716671	M	Material examinado en colección
DHMECN 1602	<i>Adenomera sp 9</i>	Puerto misahuallí, estación biológica Jatun Sacha	400	-1.049999	-77.716671	M	Material examinado en colección
DHMECN 1603	<i>Adenomera sp 9</i>	Puerto misahuallí, estación biológica Jatun Sacha	400	-1.049999	-77.716671	M	Material examinado en colección
DHMECN 12042	<i>Adenomera sp 9</i>	Los Encuentros, Paquisha	0	-3.762543	-78.645964	M	Material examinado en colección
DHMECN 1995	<i>Adenomera sp 9</i>	Santa Clara, Gavilán Anzu	800	-1.288031	-77.930783	M	Material examinado en colección

DHMECN 9150	<i>Adenomera sp 9</i>	Macas, Gral. Proaño	1097	-2.272176	-78.151321	M	Material examinado en colección
DHMECN 1595	<i>Adenomera sp 9</i>	Macas, Macas	1000	-2.317486	-78.124643	M	Material examinado en colección
DHMECN 3110	<i>Adenomera sp 9</i>	Cononaco, Kawimeno, OBE	200	-0.963778	-75.873124	M	Material examinado en colección
DHMECN 3123	<i>Adenomera sp 9</i>	Cononaco, Kawimeno, OBE, Punto 2	200	-0.963778	-75.873124	M	Material examinado en colección
DHMECN 3375	<i>Adenomera sp 9</i>	Cononaco, Obe Occidental	230	-1.138267	-75.887722	M	Material examinado en colección
DHMECN 10008	<i>Adenomera sp 9</i>	Cononaco, Parque Nacional Yasuní. Bloque 31. Plataforma Apaika.	208	-0.859275	-75.915381	M	Material examinado en colección
DHMECN 10009	<i>Adenomera sp 9</i>	Cononaco, Parque Nacional Yasuní. Bloque 31. Plataforma Apaika.	208	-0.817538	-75.909566	M	Material examinado en colección
DHMECN 6900	<i>Adenomera sp 9</i>	Chonta Punta, Reserva Yachana, GVI, Mondaña	800	-0.972725	-77.529089	M	Material examinado en colección
DHMECN 6901	<i>Adenomera sp 9</i>	Chonta Punta, Reserva Yachana, GVI, Mondaña	800	-0.972725	-77.529089	M	Material examinado en colección
DHMECN 6902	<i>Adenomera sp 9</i>	Chonta Punta, Reserva Yachana, GVI, Mondaña	800	-0.972725	-77.529089	M	Material examinado en colección

DHMECN 6903	<i>Adenomera sp 9</i>	Chonta Punta, Reserva Yachana, GVI, Mondaña	800	-0.972725	-77.529089	M	Material examinado en colección
DHMECN 6905	<i>Adenomera sp 9</i>	Chonta Punta, Reserva Yachana, GVI, Mondaña	800	-0.972725	-77.529089	M	Material examinado en colección
DHMECN 14124	<i>Adenomera sp 9</i>	Mera, Reserva Sumak Kawsay in situ	1100	-1.406143	-78.049218	M	Material examinado en colección
DHMECN 17332	<i>Adenomera sp 9</i>	Cumandá, Rio Cuyuimi	1257	-	-	M	Material examinado en colección
DHMECN 10697	<i>Adenomera sp 9</i>	Patuca, San Simón	938	-2.858318	-78.233954	M	Material examinado en colección
DHMECN 10698	<i>Adenomera sp 9</i>	Patuca, San Simón	938	-2.858318	-78.233954	M	Material examinado en colección
DHMECN 1597	<i>Adenomera sp 9</i>	Curaray, Tigüino	300	-1.399997	-76.616665	M	Material examinado en colección
DHMECN 7539	<i>Adenomera sp 2</i>	General Farfan, Cooperativa la Balsareña	607	0.201347	-76.632527	F	Material examinado en colección
DHMECN 6841	<i>Adenomera sp 2</i>	Limoncocha, Joya de los Sachas	274	-0.307377	-76.613002	F	Material examinado en colección
DHMECN 8898	<i>Adenomera sp 2</i>	El Dorado de Cascales, Avié	320	0.294544	-77.100966	M	Material examinado en colección
DHMECN 8872	<i>Adenomera sp 2</i>	Pacayacu, El Porvenir	240	0.184454	-76.622868	M	Material examinado en colección

DHMECN 9003	<i>Adenomera sp 2</i>	General Farfan, El Porvenir	240	0.184454	-76.622868	M	Material examinado en colección
DHMECN 5028	<i>Adenomera sp 2</i>	La Joya de los Sachas, Joya de los Sachas	276	-0.300069	-76.848483	M	Material examinado en colección
DHMECN 3672	<i>Adenomera sp 2</i>	Tarapoa, Pozo Fanny 18B-100	230	-0.218478	-76.345183	M	Material examinado en colección
DHMECN 8268	<i>Adenomera sp 2</i>	Jambelí, Reserva Ecologica Cofan Bermejo	312	0.25655	-77.170293	M	Material examinado en colección
DHMECN 12512	<i>Adenomera sp 2</i>	Limoncocha, Reserva limoncocha	260	-0.382758	-76.608496	M	Material examinado en colección
DHMECN 7839	<i>Adenomera sp 2</i>	General Farfan, Santa Elena	304	0.140888	-76.670107	M	Material examinado en colección
DHMECN 7841	<i>Adenomera sp 2</i>	General Farfan, Santa Elena	304	0.140888	-76.670107	M	Material examinado en colección
DHMECN 7838	<i>Adenomera sp 2</i>	General Farfan, Santa Elena	304	0.140888	-76.670107	M	Material examinado en colección
DHMECN 3951	<i>Adenomera sp 2</i>	Tarapoa, Tarapoa, MPF	220	-0.177152	-76.342808	M	Material examinado en colección
DHMECN 9196	<i>Adenomera sp 2</i>	Tarapoa, Tarapoa	239	-0.125958	-76.324862	M	Material examinado en colección
DHMECN 9198	<i>Adenomera sp 2</i>	Tarapoa, Tarapoa	239	-0.125958	-76.324862	M	Material examinado en colección

Realizado por: Pasmai, 2024.

Figura 2. Árbol filogenético completo.

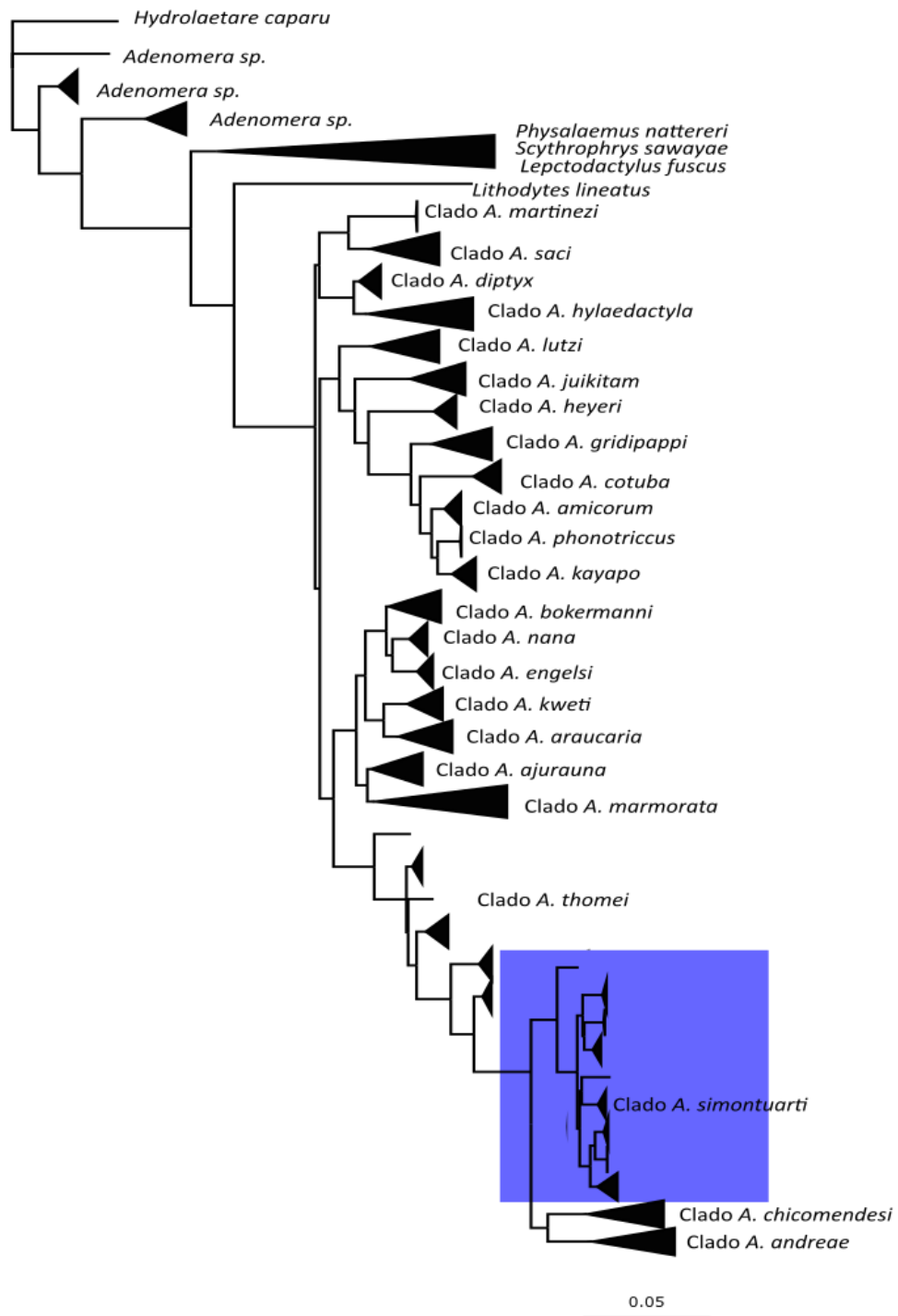


Tabla 2. Lista de caracteres de vocalizaciones utilizados para caracterizar la vocalización de *Bufonidae* (B) y *Hylidae* (H) en el estudio de Cocroft y Ryan [50].

Parámetros	Característica medida
Longitud de canto (ms)	Tiempo transcurrido desde el principio hasta el final de una vocalización. Medido a partir de la pantalla del analizador de forma de onda o, para las vocalizaciones de Bufo de más de 11-5 s, mediante cronómetro.
Tiempo del pico de la vocalización (ms)	Tiempo transcurrido desde el inicio de la vocalización hasta el punto de máxima amplitud.
Tasa de vocalización (cantos/minutos)	(Número total de vocalizaciones "1)/tiempo transcurrido desde el inicio de la primera vocalización hasta el inicio de la última.
Frecuencia dominante	Frecuencia de la vocalización que contiene la mayor energía, determinada a partir de la transformada de Fourier de (H) toda la vocalización.
Frecuencia fundamental (HZ) (1 armónica)	Frecuencia dominante aproximadamente igual al intervalo entre armónicos o a algún múltiplo entero de dicho intervalo.
Cambio en la frecuencia dominante (Hz)	Frecuencia dominante al final de la vocalización menos la del principio de la vocalización.

Realizado por: Pasmai, 2024.