

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Postgrados

**Relación entre el canto de anuncio y variables ecológicas y ambientales
de especies del clado *Epipedobates* (Anura: Dendrobatidae)**

Margarita Baquero-Rivadeneira

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Master en
Ecología

Quito, Junio 2012

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Relación entre el canto de anuncio y variables ecológicas y ambientales de especies del clado *Epipedobates* (Anura: Dendrobatidae)

Margarita María Baquero Rivadeneira

Esteban Suárez, PhD.

Director de tesis

Kelly Swing, PhD.

Miembro del comité de tesis

Luis A. Coloma, PhD.

Miembro del comité de tesis

Esteban Suárez, PhD.

Director de la Maestría

Stella de la Torre, PhD.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Víctr Viteri Breedy, PhD.

Decano del Colegio de Posgrados

Quito, Junio de 2012

©Derechos de autor: Margarita María Baquero Rivadeneira

2012

RESUMEN

Los anuros neotropicales son uno de los grupos faunísticos que actualmente requieren mayores esfuerzos de investigación. Aun es poco lo que se conoce acerca de la variación geográfica en la vocalización de muchos grupos de anuros en el Neotrópico. En especial, desconocemos el papel que los factores climáticos podrían tener en las vocalizaciones. La presente investigación integra datos comportamentales (acústicos) y ecológicos de las especies del clado *Epipedobates*. Se evalúa si existe evidencia de que las variables del canto pudieron haber evolucionado como respuesta a la influencia de presiones ambientales como la precipitación, la temperatura y la altitud.

Existe una diferencia clara del canto de anuncio entre las especies del clado *Epipedobates*, dicha diferencia es con respecto a las variables espectrales de frecuencia y en segundo lugar con respecto a la duración de las notas producidas en el canto. Un patrón similar ocurre entre las poblaciones de *Epipedobates anthonyi*. Las especies del clado también se diferencian por las características ambientales del hábitat donde viven, aunque estas diferencias son menos claras que las diferencias acústicas entre las mismas. Se identificó a la altitud como la variable ambiental más importante que explica las diferencias en las frecuencias y la duración de la nota del canto de anuncio del clado *Epipedobates*. Además, se encontró que existe una relación inversa altamente significativa entre el tamaño del individuo (LRC) y la Frecuencia Dominante emitida en el canto dentro del clado *Epipedobates*.

La relación entre las variables acústicas y ambientales analizadas en este estudio apoyan el modelo de selección divergente en asociación con el clima o con el aislamiento producido por el levantamiento de Los Andes.

ABSTRACT

Neotropical Anurans are faunistic groups that need a lot of investigation effort due to their high rate of extinction. It is not much what is known about the geographic variation of the advertisement call in a lot of Neotropical frogs. This investigation integrates behavior (acoustic) and ecological data of the *Epipedobates* clade. It evaluates if there is evidence that shows that the calls could have evolved as a response to environmental pressures as precipitation, temperature and altitude.

The advertisement call of the five species of the *Epipedobates* clade differ clearly with respect to the spectral variables and to the note duration. Something similar occurs between the *Epipedobates anthonyi* populations. The five species also differ on the environmental variables where they live, though these differences are not as clear as the acoustic. The altitude was the most important environmental variable that explains the acoustic differences (spectral and temporal variables) in the *Epipedobates* clade. It was also found that there exists an inverse relationship between the size (snout-vent length) and the Dominant Frequency of the calls inside the clade.

The relationship between the acoustic and environmental variables studied support the divergent selection model associated with the weather or with the isolation related to the lift of The Andes.

TABLA DE CONTENIDOS

TITULO.....	
HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS.....	
DERECHOS DE AUTOR.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
BREVE REVISIÓN DE ESTUDIOS ANTERIORES.....	5
PREGUNTAS Y OBJETIVOS.....	6
ÁREA DE ESTUDIO.....	7
METODOLOGÍA.....	7
GRABACIÓN DE CANTOS.....	7
OBTENCIÓN DE VARIABLES DE CANTOS.....	8
OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES ECOLÓGICAS.....	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	10
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	20
RECOMENDACIONES.....	21
LITERATURA CITADA.....	36
APÉNDICE 1.....	41
ANEXO 1.....	43
ANEXO 2.....	43
ANEXO 3.....	45

INTRODUCCIÓN

Los anuros neotropicales son uno de los grupos faunísticos que actualmente requieren mayores esfuerzos de investigación. Las poblaciones de anfibios, a nivel mundial, están declinando y alrededor del 40% de las especies se enfrentan a una extinción inminente (Wake, 2012). Por un lado, los anfibios están experimentando elevadas tasas de extinción o disminución de sus poblaciones, debido a la combinación y acumulación de varios factores, como lo son los aparentemente relacionadas con patógenos emergentes, en este caso el hongo quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) causante de la quitridiomycosis (Rödder *et al.* 2009), calentamiento global (Pounds *et al.* 2006; La Marca, 2005) y destrucción del hábitat por acción humana (Wake, 2012). Por otro lado, los anuros son uno de los grupos más diversos del Neotrópico y aun existen grandes vacíos en la comprensión de sus patrones de especiación, distribución, historia natural y abundancia actuales.

Uno de los aspectos de la ecología de los anfibios que ha recibido menos atención es el relacionado con la variación y el rol ecológico de sus patrones de vocalización o cantos de apareamiento. En el caso de los machos, por ejemplo, estos patrones podrían ser críticos en el comportamiento territorial y reproductivo, e incluso en la comprensión de la historia evolutiva y la distribución actual de varias especies. Desde esta perspectiva, en las últimas décadas el estudio geográfico comparativo se ha enfocado en la evolución del comportamiento y, en particular, en la evolución de aquellos caracteres importantes de aislamiento precigótico, incluyendo las vocalizaciones (Castellano y Giacoma, 2000; Funk *et al.* 2009; Pröhl *et al.* 2007; Herring y Verrell, 1996). En particular, se podría suponer que la selección natural favorecería ciertas características que maximicen la comunicación con el receptor, sin importar el ruido de fondo (Amézquita *et al.* 2006). Desde esta perspectiva, la comparación de características ambientales y las variables acústicas del canto, provee información sobre los procesos de especiación y evolución en anfibios (Ryan, 1988a). Por ejemplo, aunque el número de notas del canto de *Allobates femoralis* varía entre diferentes zonas, esta variación podría deberse a que esta especie incluye en realidad varias crípticas (Montanarin *et al.* 2011). Amézquita *et al.* (2009) también encontró que poblaciones de *A.*

femoralis tienen una diferenciación acústica significativa que está relacionada con la divergencia genética y las distancias geográficas. De manera similar, Bee *et al.* (2010) estudiaron individuos de *Pseudacris maculata* y observaron que tanto la duración del canto como la tasa de repetición de notas exhiben una variación geográfica significativa entre poblaciones molecularmente identificadas dentro de esta especie. Sin embargo, también se piensa que podría tratarse de dos especies distintas: *P. maculata* y *P. triseriata*. En dendrobátidos aposemáticos como *Dendrobates pumilio* se concluyó que la combinación de la geografía y la morfología es la responsable de la variación del canto de anuncio dentro de la especie (Pröhl *et al.* 2007).

A pesar de estos avances, aun es poco lo que se conoce acerca de la variación geográfica en la vocalización de muchos grupos de anuros en el Neotrópico. En especial, desconocemos el papel que los factores climáticos podrían tener en las vocalizaciones y en la diferenciación morfológica de diferentes grupos de anfibios, a pesar de que tales influencias ya han sido sugeridas en el pasado. Jang *et al.* (2011), por ejemplo, afirman que, posibles factores que influyen en la selección sexual pueden incluir al hábitat, predadores, o a las interacciones reproductivas entre especies emparentadas. En este contexto, se necesitan más estudios sobre la integración entre características comportamentales y cantos. Al mismo tiempo, estos estudios debería incorporar la influencia de otras variables (*e.g.* tamaño corporal) que podrían afectar las características del canto de diferentes especies. Bosch y de la Riva (2004), por ejemplo, mostraron que una relación inversa entre el tamaño corporal (longitud de la laringe) y las frecuencias del canto emitidas (Bosch y De la Riva, 2004). De igual manera, Boeckle *et al.* (2009) y Kime *et al.* (2000) afirman que la selección en la frecuencia del canto puede ser confundida por la selección en el tamaño del individuo (LRC). Meenderink *et al.* (2010), encontraron que este factor morfológico (LRC) varía sistemáticamente con respecto a la altitud.

La familia de ranas Dendrobatidae es monofilética (Blackburn y Wake, 2011) y se distribuye en Centro América desde Nicaragua hasta Panamá, y en América del Sur desde las Guayanas, hasta el sur de Bolivia y sur-este de Brasil (Blackburn y Wake, 2011; Santos *et al.* 2009). Por su diversidad (~290 especies descritas), esta familia constituye un grupo ideal para estudiar variaciones geográficas en patrones de vocalización en los anuros del Neotrópico. Adicionalmente, varias especies de dendrobátidos suelen ocupar un rango

amplio de condiciones ambientales, lo que genera marcados contrastes que ayudan a caracterizar la diversidad de vocalizaciones en otros grupos similares de anuros neotropicales. Dentro de Dendrobatidae, el clado *Epipedobates* es un excelente grupo para explorar posibles relaciones entre el canto de anuncio y las variables ecológicas o ambientales. Las razones para esto son las siguientes: i) presenta especies con grandes diferencias en cuanto a la amplitud de su distribución; ii) cuenta con un reciente análisis filogenético del grupo (Santos, 2002; Santos *et al.* 2009)(Figura 1); iii) la mayoría o el total de especies dentro del grupo son conocidas (Cisneros-Heredia y Yáñez-Muñoz (2010); iv) Graham *et al.* (2004) sugieren que las gradientes altitudinales pueden ser muy importantes en la especiación de *Epipedobates*, y v) existe un estudio inicial sobre la evolución del canto en el clado *Epipedobates*, el cual sugiere que variables como la frecuencia fundamental del canto estarían sujetas a presiones adaptativas ambientales (Baquero-Rivadenerira, 2006).

En este contexto, la presente investigación pretende integrar datos comportamentales (acústicos) y ecológicos de las especies del clado *Epipedobates*. Mi objetivo general es evaluar si existe evidencia de que las variables del canto pudieron haber evolucionado como respuesta a la influencia de presiones ambientales como la precipitación, la temperatura y la altitud.

BREVE REVISIÓN DE ESTUDIOS ANTERIORES

Los Andes representan un sistema topográfico y ambiental complejo, marcado por la riqueza de especies y endemismo. El modelo actual de diversificación propone que la especiación de los anuros en los Andes ecuatorianos estuvo basada en eventos de vicarianza asociados al levantamiento de los Andes en el Mioceno-Pleistoceno y a las depresiones ecológicas climáticas en diferentes tipos de vegetación (Graham *et al.* 2004). Específicamente, se ha sugerido que en anuros, la diversificación fue causada por la combinación del aislamiento y selección divergente en respuesta al apareamiento o cambio en la distribución de diferentes hábitats (Graham *et al.* 2004). Además, este modelo predice que especies hermanas deben ocupar espacios geográficos y ambientales distintos.

Funk *et al.* (2009) estudiaron dos especies hermanas Amazónicas *Engystomops petersi* y *E. freibergi*. Ellos evaluaron el rol de la variación de las señales acústicas y encontraron que,

en ambas especies, la divergencia del canto y el aislamiento del comportamiento están implicados en la especiación. Evidencia de esto es la reciente divergencia en el canto de anuncio de ambas especies en escalas espaciales y evolutivas. En un estudio realizado con dos linajes alopátricos de *Physalaemus pustulosus* en Costa Rica, se encontró que la variación geográfica en la estructura poblacional del canto de anuncio en diferentes poblaciones se atribuye a las diferencias de hábitat en conjunto con la falta de conexión entre ambos linajes de *Physalaemus* (Jang *et al.*, 2011).

Baquero-Rivadeneira (2006) estudió la evolución del canto de anuncio en las mismas especies del clado *Epipedobates*, y encontró que las variables temporales son las que principalmente diferencian a las especies del clado (con excepción de *E. boulengeri*). Sin embargo, en este estudio se eliminó al efecto del tamaño y la temperatura previo a los análisis acústicos comparativos. Las variables espectrales (frecuencia) también lograron diferenciar el canto de las especies. Al realizar el mapeo de las variables acústicas en dos posibles filogenias moleculares se encontró que ciertas variables acústicas (notas por llamada, tiempo de subida y frecuencias dominante) son consistentes con la filogenia molecular mientras que otras variables no lo son. Este patrón apoya el modelo de evolución en mosaico, donde ciertos caracteres permanecen estables a lo largo del tiempo mientras que otros cambian. Concluye que el sistema de comunicación está afectado por varios factores como la selección sexual, fisiología sensorial, morfología y la bioacústica del ambiente y que estudios complementarios tomando en cuenta estos aspectos contribuirían para explicar mejor la evolución del canto de anuncio en estas especies.

PREGUNTAS Y OBJETIVOS

El estudio se realizó a nivel específico y también poblacional (23 poblaciones) en cinco de las seis especies conocidas de ranas venenosas (Dendrobatidae) del género *Epipedobates* (*E. anthonyi*, *E. boulengeri*, *E. darwinwallacei*, *E. machalilla*, y *E. tricolor*). *Epipedobates espinosai* se considera aquí como sinónimo junior de *E. boulengeri* hasta que su situación taxonómica sea clarificada (Cisneros y Yáñez-Muñoz, 2010). No se obtuvieron grabaciones del canto de *Epipedobates narinensis* del departamento de Nariño en el sur de Colombia.

La presente investigación pretende evaluar si las variaciones interespecíficas en la estructura del canto de las especies del clado *Epipedobates*, e intra específicas entre las poblaciones de *E. anthonyi*, están correlacionadas con variaciones en variables ambientales críticas como temperatura, precipitación y altitud, de las áreas geográficas ocupadas por cada especie o población. Además, se evalúa si el tamaño del cuerpo (longitud rostro-cloacal, LRC), tiene algún efecto o relación con las variables acústicas del canto.

ÁREA DE ESTUDIO

En el Ecuador, las especies del clado *Epipedobates* (*E. anthonyi*, *E. boulengeri*, *E. darwinwallacei*, *E. machalilla* y *E. tricolor*), se distribuyen en las zonas bajas y a lo largo de las estribaciones de la cordillera occidental los Andes desde el norte hasta el sur del Ecuador. Específicamente, el área de estudio corresponde a las provincias del Azuay, Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Manabí, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas (Figura 2 y Figura 3). El tipo de vegetación donde se distribuye el clado *Epipedobates* corresponde a las formaciones naturales de Bosques deciduos y semideciduos, Bosques siempreverdes y Bosques inundados de tierras bajas, Bosques siempreverdes piemontanos, Bosques siempreverdes montano bajos y Matorral seco (Sierra *et al.*, 1999). El rango altitudinal en el que se encuentran los especímenes incluidos en el estudio varía entre 30m y 1557m, mientras que la precipitación media anual oscila entre 317 y 7432 mm y el promedio de temperatura entre los 18.6°C y los 29°C. Detalles de cada localidad de grabación se encuentran en el Apéndice 1.

METODOLOGÍA

Grabación de cantos

Los cantos utilizados para esta investigación fueron grabados durante varias salidas de campo realizadas entre junio de 2005 y febrero de 2010. La grabación de los cantos se realizó con dos tipos de grabadoras: una grabadora tradicional SONY Stereo Cassette-Corder WM-D6C Walkman Professional y una digital Olympus Digital Recorder PCM LS-5. Con ambas grabadoras se utilizó un micrófono Sennheiser ME 67 unidireccional. El

equipo y la metodología requeridos en las grabaciones de campo se ajustaron al protocolo propuesto por Heyer *et al.* (1994). Durante las grabaciones se trató de colocar el micrófono a la menor distancia posible al animal, procurando que sea entre 0,5 y 1,5m. En lo posible se capturó al individuo grabado para su posterior identificación y medición de la longitud rostro-cloacal (LRC). En cada población se grabó al mayor número de individuos posible, obteniendo un mínimo de dos y un máximo de seis individuos/población. El número de individuos grabados por cada especie varió entre un mínimo nueve y un máximo de 42 animales.

Para la digitalización de los cantos grabados en cassettes, se utilizó el programa SoundEffects v.0.9.1 (Ricci 1994) en una computadora Macintosh Power PC. La frecuencia de muestreo usada fue de FFT 44,1 KHz y 16 bits.

Obtención de las variables del canto

La edición y generación de oscilogramas, espectrogramas y espectros se realizó con el programa RavenPro 1.2. para Mac OS X (Charif *et al.* 2004). Para comparar los caracteres del canto reportados en estudios acústicos la unidad de análisis debe ser definida con base en homología entre las unidades del canto. En este estudio se consideran homólogas a las unidades acústicas que se producen en un solo ciclo respiratorio y la correspondiente contracción de los músculos del tronco. El canto de anuncio en dendrobátidos ha sido caracterizado y en caso del género *Epipedobates* el tipo de canto corresponde a un “trino” (sensu Lötters *et al.* 2003). Los cantos tienen caracteres bien definidos: 1) Todos los cantos están formados por la agrupación de varias notas, 2) la frecuencia dominante es la segunda armónica, 3) ésta y la frecuencia fundamental permanecen constantes durante el canto y 4) las notas no presentan modulación de frecuencia y no son pulsadas.

Para obtener la información numérica de los parámetros físicos y espectrales, en el panel de medidas se seleccionaron las siguientes 15 variables para cada nota: variación del tiempo (delta time), tiempo de mayor amplitud (peak time), tiempo inicial (begin time), frecuencia fundamental (low frequency), frecuencia dominante (max frequency), frecuencia más alta (high frequency), variación de frecuencia (delta frequency), tiempo final (end time), largo de marcos (length frames), amplitud máxima (max amplitude),

máxima energía (max power), tiempo de mayor energía (max time), amplitud mínima (min amplitud), tiempo de menor energía (min time), y pico en la amplitud (peak amp). Además, se midió la duración total del canto desde el inicio de la primera nota hasta el final de la última nota y se contabilizó el número de notas por canto.

Debido a que ciertos parámetros pueden variar dentro del canto, para cada individuo se analizaron tres cantos y en cada canto se analizaron seis notas, dos al inicio, dos en el punto medio del canto y dos al final (Erdtmann y Amézquita, 2009). Los datos almacenados en RavenPro 1.2 fueron transferidos a una hoja electrónica de Microsoft Excel®. Se obtuvo la información numérica de 23 parámetros del canto. Estos se clasificaron en variables espectrales (i.e, frecuencias fundamental y dominante) y variables temporales que son todas las restantes relacionadas al tiempo. Para una lista detallada de los parámetros que se registraron ver Anexo 1.

Obtención de Variables Ecológicas

Para caracterizar el ambiente en donde se colectó cada especie o población y poder evaluar su potencial influencia en la variación de los patrones de vocalización, se compilaron datos climáticos y de altitud de cada una de las 23 localidades muestreadas; entre los datos climáticos se incluyó a la temperatura y la humedad ya que estas tienen una influencia directa en la transmisión del sonido (Campbell *et al.* 2010). Además, los anfibios son fisiológicamente sensibles a fluctuaciones en humedad ambiental y estacionalidad (i.e., periodos de sequía versus lluvia; Graham *et al.* 2004; Funk *et al.* 2009), por lo que, además de la transmisión del sonido, el clima podría afectar la actividad de los individuos.

Los datos de las variables bioclimáticas se obtuvieron de la base de datos WorldClim 1.4 (Hijmans *et al.* 2005) que fueron interpolados con una resolución espacial de 1x1-Km². Dentro del WorldClim, el método BIOCLIM extrae el valor de la capa que contiene los datos ambientales en cada punto o localidad de una especie determinada. Las variables bioclimáticas representan las tendencias anuales de estacionalidad y factores ambientales extremos. Las 19 variables obtenidas son derivadas de valores mensuales de temperatura (BIO1-BIO11) y precipitación (BIO12-BIO19) para generar variables biológicamente

significativas. En el Anexo 2 se encuentra una lista detallada de los parámetros ambientales utilizados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de las variables acústicas y ambientales involucró los siguientes pasos. Primero, se calculó el promedio por individuo y por población para cada variable de canto. Segundo, se realizó un análisis de normalidad de cada variable con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Las variables que no mostraron distribución normal fueron normalizadas con transformaciones a logaritmos base 10, Arco-Seno o extracción de raíz cuadrada de acuerdo a la naturaleza de los datos.

Para discriminar las variables acústicas que producen la mejor separación entre los cantos de las diferentes especies o poblaciones, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con todas las variables independientes del canto tanto para el clado *Epipedobates*, como para las poblaciones de *E. anthonyi*. A partir del ACP se seleccionó a las variables que tienen mayor peso en las diferencias acústicas entre las cinco especies o entre las poblaciones de *E. anthonyi*. Paralelamente se realizó otro ACP con todas las variables obtenidas del BIOCLIM para las especies del clado *Epipedobates*. Nuevamente, se obtuvieron las variables ambientales que influenciaron más la separación de las localidades incluidas en el análisis.

Una vez obtenidas las variables acústicas y ambientales, se realizaron Regresiones múltiples. El formato de las regresiones incluyó a los factores ambientales seleccionados en el ACP como variables independientes (predictores) y las factores acústicos como variables dependientes. Los resultados de las regresiones determinó la o las variables ambientales que explican la mayor proporción de la variación en los cantos analizados. Estos resultados permitieron explorar qué variables ambientales influyen sobre la diferenciación interespecífica e intraespecífica de los cantos. Adicionalmente, para evaluar

si existe alguna relación entre el tamaño del individuo (LRC), y la frecuencia del canto, se realizó una regresión simple relacionando estas dos variables.

RESULTADOS

Variables acústicas

Para este trabajo se analizaron los cantos de 86 individuos del género *Epipedobates* pertenecientes a 23 poblaciones (Anexo 3). Los resultados del ACP de las variables acústicas del canto de anuncio del clado *Epipedobates* se resumen en la Figura 4 y Tabla 1. Para realizar este análisis se utilizaron únicamente las siguientes variables acústicas independientes: Duración de la llamada (DL); Notas por llamada (NL); duración de la nota (Dn); duración del intervalo entre notas (In); Frecuencia Fundamental (Ff) y la Frecuencia Dominante (Fd). El Componente Principal (CP) 1, representa el 50,03% de la variación acústica total y el CP 2, el 30,69%; en conjunto los dos ejes representan más del 80% de la variación acústica total. Las variables acústicas que tienen mayor peso en el CP1 son las Frecuencias Fundamental y Dominante, conocidas como las variables espectrales. Dentro de este eje todas las especies se separan con claridad, con excepción de *E. anthonyi*, que ocupa parcialmente los espacios acústicos espectrales de *E. boulengeri*, *E. darwinwallacei* y *E. tricolor*; *E. machalilla* es la que ocupa el espacio más distante en comparación del resto de especies. Las variables acústicas con mayor peso en el CP2 fueron la Duración de la llamada, Duración de la Nota y Duración del Intervalo entre notas, variables conocidas como temporales. La de mayor peso fue la Duración de la Nota. A lo largo de este eje las especies se separan con menor claridad que en el CP1. Nuevamente, *Epipedobates anthonyi*, comparte el espacio acústico con el resto de especies del clado menos con *E. darwinwallacei*.

El ACP de las variables acústicas del canto de anuncio de las poblaciones de *Epipedobates anthonyi* se resume en la Figura 5 y Tabla 2. El CP1 representa el 51,77% de la variación

acústica y el CP2 el 26,23%; los dos componentes representan el 78% de la variación acústica total. Al igual que para el clado *Epipedobates* las variables con mayor peso en el CP1 son las variables espectrales. Las variables con mayor peso en el CP2 son las variables temporales Duración de la llamada y el Número de Notas por Llamada. La separación acústica dentro del ACP entre las poblaciones de *E. anthonyi* no son tan claras en comparación con las del clado *Epipedobates*, sin embargo la mayoría de poblaciones si se logran diferenciar de otras principalmente con respecto a valores de frecuencia del canto.

Variables ambientales.

El ACP realizado con las variables ambientales para el clado *Epipedobates* se presenta en la Figura 6 y la Tabla 3. Se utilizaron únicamente las variables no colineares que en este caso fueron todas las variables menos BIO3 y BIO7. En este análisis, el CP1 explicó un 52,03% de la variación ambiental entre localidades, mientras que el CP2 contribuyó con un 28,31%, alcanzando entre los dos ejes más del 80% de la variación total climática o ambiental entre las localidades donde fueron colectadas las especies del clado *Epipedobates*.

El CP1 está mayormente correlacionado con las variables relacionadas a la temperatura (BIO1, BIO4, BIO5, BIO6, BIO7, BIO8, BIO9, BIO10 y BIO11) y a la altitud. Dentro de este eje, ninguna especie ocupa un espacio ambiental exclusivo, sin embargo entre algunas especies si existe separación. Nuevamente, al igual que en las variables acústicas, *E. anthonyi*, ocupa un amplio rango dentro en este eje. Las variables ambientales que mayor peso tienen en el CP2 son las variables relacionadas a la precipitación (BIO12, BIO13, BIO14, BIO15, BIO16, BIO17 y BIO18) y a la altitud. *E. boulengeri* ocupa un espacio exclusivo dentro de este eje, mientras que el resto de especies se sobreponen en alguna medida y *E. anthonyi* ocupa el mayor rango a lo largo del eje.

El análisis de regresión de las variables independientes de Altitud, BIO10 y BIO14, que son las variables ambientales que mayormente separan al clado *Epipedobates* sobre la variable dependiente Fd (Frecuencia Dominante), variable acústica que más diferencia al clado *Epipedobates*, fue altamente significativo ($F=10.9873$; $gl:3$; $P = 0,0002$; Tabla 4) y con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,63. La altitud, fue la variable independiente

más significativa ($P = 0,0097$).

La regresión múltiple de las variables independientes Altitud, BIO10 y BIO14 sobre la segunda variable acústica dependiente Duración de la nota (Dn) también fue altamente significativa ($F=5,5799$; $gl:3$; $P = 0,0064$; $R^2 = 0.47$; Tabla 5), y nuevamente fue la altitud la variable independiente más significativa ($P = 0,0158$).

La regresión lineal que considera al tamaño como la variable independiente y a la Frecuencia fundamental (Ff) del canto como dependiente, dio un resultado altamente significativo para el clado *Epipedobates* ($P < 0,0001^{**}$; $R^2 = 0.81$; Tabla 6) como se observa también en la Figura 7. De igual manera, se encontró una relación altamente significativa entre la altitud y el tamaño del cuerpo para el clado *Epipedobates* ($P = 0,0009$; $R^2 = 0.42$; Tabla 7; Figura 8).

DISCUSIÓN

Diferencias acústicas del canto de anuncio entre especies (*Epipedobates*) y poblaciones (*E. anthonyi*)

El canto de anuncio es la vocalización más conspicua dentro de los anuros y tiene dos funciones: i) atraer hembras de la misma especie, y ii) advertir de su territorio a otros machos de la misma o de diferente especie (Duellman y Trueb, 1994). Los resultados de esta investigación muestran una separación acústica, a nivel espectral y temporal del canto de anuncio entre las especies del clado monofilético *Epipedobates*. Esto coincide con las suposiciones del concepto de especie aceptado por varios científicos, donde la especificidad del canto es esencial, ya que influye sobre el reconocimiento de la pareja y, por lo tanto, los aísla de otras especies (Gergus *et al.* 1997). La separación del género *Epipedobates* con respecto al canto de anuncio está dado principalmente por diferencias en los valores de las frecuencias y a la duración de las notas del canto de las diferentes especies.

Al poseer una baja tasa de migración, los anuros son propensos a desarrollar diferenciación

a nivel poblacional y regional (Clemente-Carvalho *et al.* 2008). Esto se ha observado con mayor frecuencia en poblaciones de especies de amplia distribución (Bernal *et al.* 2005), y en este caso en *E. anthonyi*, que muestra una alta plasticidad en su canto de anuncio, como lo sugieren la alta variabilidad de la frecuencia y de las dos variables temporales de sus cantos. En el ACP para las poblaciones de *E. anthonyi*, se observa diferenciación acústica entre algunas poblaciones. Estudios en aves, primates y anuros también han encontrado diferencias del canto dentro de una misma especie (Kime *et al.* 2000). Por ejemplo, las hembras de las ranas túngara discriminan el canto de anuncio entre machos de distintas poblaciones (Campbell, 2010). Así mismo, para *Dendropsophus leucophyllatus* (bajo el nombre *Hyla leucophyllata*) se ha reportado que la diferencia en la frecuencia fundamental entre las poblaciones fue significativa si esta no era ajustada al tamaño del cuerpo (Lougheed *et al.* 2006). En la medida en que estos patrones estén relacionados con la heterogeneidad ambiental, podrían reflejar procesos de diferenciación como los que eventualmente desembocarían en la separación de especies.

La divergencia evolutiva en el canto de anuncio puede representar adaptaciones locales que permitan: i) maximizar la propagación del canto; ii) minimizar la interferencia que produce el ruido de fondo; y iii) beneficiar a las señales en la evasión de predadores y parásitos (Bosch y de la Riva, 2004; Kime *et al.* 2000; Pröhl *et al.* 2006). Si el canto de anuncio del clado *Epipedobates* se adaptó para propagarse con mayor eficiencia se esperaría que cada especie emita un canto de anuncio relacionado al hábitat y a las características ambientales del sitio donde vive.

Diferencias ambientales entre especies y poblaciones

En el presente estudio se encontró que las especies del clado *Epipedobates* ocupan hábitats distintos con respecto a la altitud, temperatura y humedad del ambiente. La diferenciación no es tan clara como en los cantos de anuncio; sin embargo, los grupos sí llegan a separarse. Este patrón no es sorprendente, ya que las variables ambientales se midieron a una escala espacial bastante grande, mientras que la diferenciación de las poblaciones seguramente responde a otras variables ecológicas que operan a escalas espaciales inferiores. Las tres variables que principalmente diferencian al hábitat de las cinco especies son: la altitud, la temperatura media en el cuarto anual más caliente y la precipitación en el

mes más seco. Nuevamente se observa una sutil separación ambiental en las poblaciones de *E. anthonyi* ya que viven en sitios muy variados con amplios rangos altitudinales, de temperatura y de precipitación. Desde esta perspectiva, ya se ha documentado que los anuros neotropicales son muy sensibles a cambios de temperatura, precipitación anual y a la estacionalidad de estos dos factores (Funk *et al.* 2009), además de ser fisiológicamente sensibles a las condiciones secas. Por lo tanto, la precipitación y la temperatura podrían ser las variables ambientales significativas para limitar sus patrones de distribución (Graham *et al.* 2004; Funk *et al.* 2009).

Al relacionar la variación del canto de las especies estudiadas con el clima actual, se evidenció que las variables de Frecuencia (fundamental y dominante) y Duración de la nota en el canto, están significativamente relacionadas con la temperatura media del cuarto anual más caliente y la precipitación en el mes más seco del año. Sin embargo, el factor que explicó la mayor proporción de la variabilidad en los cantos fue la altitud a la que se encuentran las distintas especies o poblaciones. Resultados similares se han reportado para la rana coqui (*Eleutherodactylus coqui*) cuyos parámetros espectrales del canto varían sistemáticamente con el cambio de altitud sobre el nivel del mar (Meenderink *et al.* 2010; Narins y Smith, 1986).

Existe otro factor que puede afectar tanto las propiedades espectrales como temporales del canto, este es el tamaño del individuo o longitud rostro-cloacal (Narins y Smith, 1986; Bosch y de la Riva, 2004, Kime *et al.* 2000, Loughheed *et al.* 2006, Zimmerman, 1983, Jang *et al.* 2011). Dentro del clado estudiado esta relación inversa entre el tamaño del individuo y la Frecuencia Dominante es altamente significativa, esta relación se ha encontrado en otros estudios como los de Campbell, 2010; Bosch y de la Riva, 2004; Boeckle *et al.* 2009; Penna y Solís, 1998; Kime *et al.* 2000. Mientras mayor es el tamaño de la rana, mayor la longitud de la laringe y menores las frecuencias del canto emitidas (Bosch y de la Riva, 2004). Autores como Boeckle *et al.* (2009) y Kime *et al.* (2000) afirman que la selección en la frecuencia del canto puede ser confundida por la selección sobre el tamaño del individuo.

En el clado *Epipedobates* se sustenta la regla de Bergmann (1847), que afirma que los

organismos tienden a ser más grandes en climas más fríos; esto ha sido observado ampliamente en organismos endotérmicos y se ha aplicado a algunos organismos ectotérmicos. Entre los anfibios existen casos que confirman la variación clinal interespecífica de la regla de Bergmann, y también otros en los que esta regla no se aplica (Adams y Church, 2007; Cvetkovic et al. 2008; Lehr y Catenazzi, 2009; Liao y Lu, 2012; Ma et al. 2009). Sin embargo, en algunos anfibios, como en *Bufo bufo* no se encontró relación alguna entre el gradiente altitudinal y el tamaño de los individuos.

En el género *Plethodon* de salamandras se encontró que tres de las 40 especies estudiadas son consistentes con la regla de Bergmann, y que las 37 especies restantes no fueron consistentes con esta predicción, sugiriendo que esta regla no es común en anfibios. La explicación a estos patrones como una respuesta evolutiva, es la de minimizar la pérdida de calor en climas más fríos basándose en la reducción de la pérdida de calor por la relación superficie-volumen en individuos más grandes (Liao y Lu, 2012; Adams y Church, 2007). Sin embargo esta hipótesis no explica precisamente la variación clinal del tamaño en organismos ectotérmicos (Adams y Church, 2007).

Se ha observado que entre los vertebrados, los individuos generalmente son de mayor tamaño en climas más fríos, pero las explicaciones evolutivas de este patrón siguen siendo debatidas. Ya que la regla de Bergmann no siempre se cumple en anfibios, las explicaciones evolutivas que explican esta regla en otros vertebrados no necesariamente son aplicables a los anfibios (Adams y Church, 2007). Hay que tener en cuenta que al tener los anfibios ciclos de vida muy complejos, la falta de datos demográficos y ecológicos apropiados pueden afectar el entendimiento de la variación de tamaños observados en este estudio. En estudios realizados con *Bufo bufo* y otros anfibios, se encontró que el principal efecto de la altitud fue sobre la edad de los individuos; retrasando la maduración y aumentando la longevidad (Cvetkovic et al., 2008).

La variación en el tamaño del cuerpo puede estar relacionada con la variación del ambiente. Por ejemplo, la disponibilidad de diferentes microhábitats puede favorecer a ciertos tipos de morfologías (Narins y Smith, 1986). Meenderink et al. 2010, encontraron que el factor morfológico de tamaño varía sistemáticamente con respecto a la altitud. Por

lo tanto el gradiente altitudinal del tamaño y de las frecuencias pueden ser el resultado de una selección diferencial en cualquiera de estos caracteres, o en los dos (Narins y Smith, 1986). Incluso Jan *et al.* (2011) afirman que un efecto fuerte de la altitud puede ser el responsable de la variación del tamaño y de la Frecuencia Dominante entre las poblaciones de *Hyla japonica* en Corea. Esta hipótesis podría ser adoptada para el clado *Epipedobates*, ya que de igual manera se observa una fuerte relación entre la altitud y la longitud rostro-cloacal. Castillo-Trenn y Coloma (2008) encontraron que en *Allobates kingsburyi* existendiferencias tanto espectrales como temporales (duración de la llamada, notas por llamada, duración de la nota e intervalo entre notas) entre individuos grabados en el campo e individuos grabados en cautiverio. A más de la temperatura y el tamaño, estos autores afirman que otros factores, como se ha encontrado en el clado *Epipedobates*, pueden tener un papel importante en estas diferencias como la interferencia presente en dos distintos hábitats (caracterizada por el tipo y cantidad de vegetación y el ruido de fondo) y las diferencias de presión atmosférica.

Sin embargo, además de la variación morfológica por parte del emisor de la señal, puede existir también variación morfológica por parte del receptor de la misma y su sensibilidad auditiva, lo cual se reflejaría en una relación entre las mismas (Meederinki y Van Dijk, 2006; Amézquita *et al.* 2006). Se presume que esta dependencia en el tamaño del cuerpo está relacionada con los cambios correspondientes en el tamaño del oído interno. En los anfibios, el oído interno posee dos papilas anatómicamente separadas que son sensibles al sonido: la papila amphibiorum y la papila basilaris. Estas papilas responden a diferentes rangos de frecuencia y, por lo tanto, tienen funciones complementarias. La papila amphibiorum percibe frecuencias desde los 0.1 kHz hasta los 1.2kHz y la papila basilaris percibe las frecuencias mayores a 1.2kHz (Meederinki y Van Dijk, 2006; Meenderink *et al.* 2010; Schoffelen *et al.* 2008; Wilczynski *et al.* 1992). En el estudio de Liao y Liu (2008), realizado con anuros de China, se reporta una relación entre los órganos acústicos y la altitud, en la que tanto el saco vocal y el tímpano tienen una relación significativamente negativa con la altitud, y el saco vocal a su vez se correlaciona con el tímpano. A partir de estos datos, estos autores sugieren que los órganos acústicos de los anuros decrecen en tamaño con el incremento de la altitud.

La concordancia entre los caracteres espectrales del canto y la sintonización del sistema auditivo es un factor importante en el mantenimiento del aislamiento reproductivo en las especies favoreciendo el reconocimiento interespecífico de la pareja. De hecho, en *Acris crepitans* y *Physalaemus pustulosus*, la sintonización de la papila basilar de la hembra predice su comportamiento cuando escoge entre vocalizaciones de conespecíficos, variando únicamente la frecuencia dominante. La variación de los cantos y de la sintonización de los mismos son la materia prima para los procesos que dirigen la evolución de la comunicación acústica en anuros (Wilczynski *et al.* 1992).

Al controlar el efecto de la altitud, la temperatura en el cuarto anual más caliente viene a ser la segunda variable ambiental responsable de la diferenciación de las especies por los valores de frecuencias. Esta variable, a su vez, puede ser afectada por la altitud; sin embargo, como muestran los resultados, parece ser que su efecto es muy pequeño para explicar las diferencias observadas, como también se encontró en el estudio de Meedenrink *et al.* 2010.

En un estudio realizado con el sapo terrestre *Cophixalus ornatus*, Brooke *et al.* (2000) evaluaron la influencia de las condiciones del medio físico en la actividad del canto de esta especie. A partir de datos de temperatura, precipitación, visibilidad/iluminación de la luna, humedad, presión barométrica y la intensidad del canto en la época de apareamiento, este estudio sugiere que condiciones ambientales como la temperatura, humedad, iluminación de la luna, presión barométrica y el viento, actúan sobre amplias escalas espaciales y pueden determinar las condiciones ambientales específicas en las que los cantos ocurren (Brooke *et al.*, 2000).

Ya que en la presente investigación se obtienen datos climáticos y ecológicos actuales es importante tener en cuenta que existe una tendencia en especies y clados de mantener a lo largo del tiempo el nicho y los caracteres ecológicos relacionados a este; a esta tendencia se la conoce como Conservación del Nicho. El hecho de que la Conservación del Nicho ocurra a distintas escalas es parte de lo que lo hace tan relevante, desde respuestas de las especies a cambios durante décadas hasta patrones biogeográficos a gran escala y riqueza de especies generada a lo largo de cientos de millones de años.(Wiens *et al.*, 2010).

Lynch y Duellman (1997) proponen un modelo de especiación de los Anuros Andinos basado en eventos de vicarianza que se producen por el aislamiento asociado con el levantamiento de Los Andes y las depresiones climáticas de las zonas de vegetación. Sugieren que la especiación ocurrió por la combinación del aislamiento y la selección divergente con relación a los diferentes hábitats que ocupan. Este modelo predice que, si especies hermanas alopátricas se segregan en el espacio ambiental, entonces es posible que una selección mediada por el ambiente tenga un papel en la especiación. Alternativamente, si especies hermanas alopátricas se encuentran en un espacio ambiental casi idéntico, entonces la divergencia ecológica no es un factor importante, sugiriendo alternativas selectivas como la divergencia incidental en aislamiento (Graham *et al.* 2004). Para el clado *Epipedobates*, especies hermanas como *E. machalilla* y *E. anthonyi* ocupan espacios ambientales distintos y a su vez estas dos especies con su especie hermana *E. tricolor*, corroborando con lo que encontraron Santos *et al.* 2009, quienes reportaron que las zonas de transición montano bajas entre los ambientes Andinos y de zonas bajas (Chocó y Amazonía) promovieron la diversificación como se ejemplifica con el género Amazónico *Ameerega* y el género del Chocó de este estudio *Epipedobates* (Santos *et al.* 2009).

Graham *et al.* (2004) encontraron un reemplazo altitudinal de especies parapátricas en el occidente del Ecuador, específicamente para el clado *Epipedobates*. Con base en esos resultados, concluyen que el análisis de anuros Andinos apoya el modelo de selección divergente en asociación con el clima o con el aislamiento producido por el levantamiento de Los Andes. El mismo modelo de selección es propuesto por Jang *et al.* (2011), al encontrar diferencias acústicas relacionadas a la altitud en *Hyla japonica* en Corea. Es muy probable que taxa con bajo rango de migración, como los anuros, pueden responder con mayor fuerza a los gradientes en la escala espacial que animales como las aves o los mamíferos que poseen una alta capacidad o rango de migración (Graham *et al.* 2004).

De acuerdo a la hipótesis de la selección ambiental, las diferencias de las características del hábitat que pueden afectar en la diferenciación de caracteres acústicos pueden dar como resultado variación del canto intra e inter-específica (Bosch y de la Riva, 2004). Por otro lado, el modelo de aislamiento por distancia, afirma que, a medida que las distancias

geográficas aumentan, las diferencias entre poblaciones aumentan estocásticamente (Bernal *et al.* 2005; Castellano *et al.* 2009). Este modelo fue por primera vez propuesto por Wright (1943), y predice que las poblaciones que se encuentran geográficamente más cercanas unas a otras deben separarse por distancias fenotípicas menores tomando forma de gradiente (Bernal *et al.* 2005). Esto no ocurre en el clado *Epipedobates anthonyi*, para el cual la distancia geográfica no representa de ninguna manera las distancias acústicas de las poblaciones.

CONCLUSIONES

- Existe una diferencia clara del canto de anuncio entre las especies del clado *Epipedobates*, dicha diferencia es con respecto a las variables espectrales de frecuencia y en segundo lugar con respecto a la duración de las notas producidas en el canto. Un patrón similar ocurre entre las poblaciones de *Epipedobates anthonyi*.
- Las especies del clado *Epipedobates* también se diferencian por las características ambientales del hábitat donde viven, aunque estas diferencias son menos claras que las diferencias acústicas entre las mismas.
- Se identificó a la altitud como la variable ambiental más importante que explica las diferencias en las frecuencias y la duración de la nota del canto de anuncio del clado *Epipedobates*.
- Existe una relación inversa altamente significativa entre el tamaño del individuo (LRC) y la Frecuencia Dominante emitida en el canto dentro del clado *Epipedobates*. La selección en la frecuencia del canto puede ser confundida por la selección sobre el tamaño del individuo (LRC). El presente estudio confirma y corrobora con lo que afirma la regla de Bergmann en el que a mayor altitud y, por lo tanto, menor temperatura, mayor es el tamaño de los individuos. Se presume que esta dependencia en el tamaño del cuerpo (LRC) podría estar relacionada con los

cambios correspondientes en el tamaño del oído interno e incluso se considera que los órganos acústicos de los anuros decrecen en tamaño con el incremento de la altitud.

- Las variables acústicas y ambientales analizadas en este estudio corroboran lo realizado por Graham *et al.* (2004), y apoyan el modelo de selección divergente en asociación con el clima o con el aislamiento producido por el levantamiento de Los Andes.
- Es evidente la plasticidad de *Epipedobates anthonyi* para vivir en amplios rangos de distribución altitudinal y latitudinal, y su capacidad para emitir vocalizaciones con amplios rangos de variables espectrales y temporales.

RECOMENDACIONES

Ya que los caracteres de reconocimiento de la especie y elección de la pareja implican cambios evolutivos relativamente rápidos que deberían ser reflejados en su historia filogenética (Erdtmann y Amézquita, 2009; Boeckle *et al.*, 2009), es necesario complementar esta investigación con el análisis molecular más actualizado del clado. Con esta comparación se lograrían realizar con más precisión las predicciones sobre el papel relativo de cada factor en el proceso de especiación como lo recomienda Loughheed *et al.* (2006).

Al identificar que la altitud es la variable ambiental, pero no climática, que mayor efecto tiene sobre la evolución del canto de anuncio del clado *Epipedobates*, sería muy importante investigar qué factores relacionados a la altitud son los que más efecto han tenido sobre las vocalizaciones y las especies. Otras variables climáticas como la presión atmosférica, el viento o la iluminación de la luna en combinación con variaciones morfológicas como las del oído de los receptores de los cantos, permitirían dilucidar con precisión cuál ha sido el proceso evolutivo que ha sufrido este clado. Sin embargo el efecto de la altitud sobre la estructura del oído interno de los anuros es un factor que debe también ser estudiado y analizado ya que varios estudios reportan una relación general entre estos órganos y la altitud.

Es necesario un estudio exhaustivo que vincule la relación inversa entre el tamaño del individuo (LRC) y la Frecuencia Dominante emitida en el canto; a su vez que analice la posible relación que puede existir entre los órganos acústicos (tanto de emisión como de recepción del canto) con la Frecuencia del canto y la altitud; ya que la selección en la frecuencia del canto puede ser confundida por la selección sobre el tamaño del individuo (LRC) además que en algunos casos se reporta una relación inversa entre los órganos acústicos y la altitud.

Sería muy interesante realizar un estudio de *Epipedobates anthonyi* con más poblaciones y combinarlo con análisis moleculares para conocer en qué estado evolutivo se encuentra la especie y qué presiones selectivas sobre sus vocalizaciones son las que más influyen.

La población de Lita de *Epipedobates boulengeri* presentó un dato atípico en comparación con las otras poblaciones de su especie, tanto en las variables acústicas como en las variables ambientales presentes en el hábitat donde vive. Un estudio más detallado de esta población permitiría identificar las razones de este dato atípico, que a su vez puede estar relacionado con *E. espinosai* que en este estudio se considera sinónimo junior de *E. boulengeri*.

Tabla 1. Resultados estadísticos obtenidos del Análisis de Componentes Principales (ACP) para el canto de anuncio del clado *Epipedobates*.

EIGENVALUES

	Magnitud	Variación explicada
Componente 1	7,00	50,03
Componente 2	4,29	30,69

EIGENVECTORS

	Comp. 1	Comp. 2
Duración llamada (DL)	0,486	0,390
Notas por llamada (NL)	0,318	0,044
Duración nota (Dn)	-0,050	0,676
Duración intervalo entre notas (In)	0,340	0,446
Frecuencia fundamental (Ff)	0,518	-0,319
Frecuencia dominante (Fd)	0,525	-0,298

Tabla 2. Resultados estadísticos obtenidos del Análisis de Componentes Principales (ACP) para el canto de anuncio de diez poblaciones de *Epipedobates anthonyi*.

EIGENVALUES

	Magnitud	Variación explicada
Componente 1	3,10	51,77
Componente 2	1,57	26,23

EIGENVECTORS

	Comp. 1	Comp. 2
Duración llamada (DI)	0,141	0,735
Notas por llamada (NL)	0,371	0,567
Duración nota (Dn)	-0,356	0,226
Duración intervalo entre notas (In)	-0,421	0,043
Frecuencia fundamental (Ff)	0,521	-0,205
Frecuencia dominante (Fd)	0,517	-0,201

Tabla 3. Resultados estadísticos obtenidos del Análisis de Componentes Principales (ACP) para las variables ambientales del clado *Epipedobates*.

EIGENVALUES

	Magnitud	Variación explicada
Componente 1	9,89	52,03
Componente 2	5,38	28,31

EIGENVECTORS

	Comp. 1	Comp. 2
Altitud	-0,257	-0,226
Altitud Derivada	-0,264	-0,224
BIO 1	0,301	0,120
BIO 2	0,017	-0,314
BIO 4	0,240	-0,038
BIO 5	0,302	-0,001
BIO 6	0,257	0,235
BIO 8	0,303	0,115
BIO 9	0,287	0,122
BIO 10	0,306	0,111
BIO 11	0,286	0,147
BIO 12	-0,179	0,322
BIO 13	-0,170	0,228
BIO 14	-0,136	0,363
BIO 15	0,125	-0,281
BIO 16	-0,184	0,250

BIO 17	-0,158	0,339
BIO 18	-0,098	0,309
BIO 19	-0,212	0,161

Tabla 4. Regresión múltiple lineal de la altitud, BIO10 y BIO14 sobre la Frecuencia dominante (Fd).

Analysis of variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	3	1285370.3	428457	10.9873
Error	19	740916.1	38996	Prob>F
C.Total	22	2026286.4		0.0002*

Summary of Fit	
R Square	0.634348
R Square Adj	0.576613
Root Mean Square Error	197.473
Mean of Response	2406.259
Observations (or Sum Wgts)	23

Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	8457.1551	2860.439	2.96	0,0081*
ALTITUD	-1.497144	0.520844	-2.87	0,0097*
BIO 10	-10.69785	10.22982	-1.05	0.3088
log10 BIO14	-173.941	202.7132	-0.86	0.4016

Tabla 5. Regresión múltiple lineal de la altitud, BIO10 y BIO14 sobre la Duración de la nota (Dn).

Analysis of variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	3	74.02565	24.6752	5.5799
Error	19	84.02107	4.4222	Prob>F
C.Total	22	158.04672		0,0064*

Summary of Fit	
R Square	0.468378
R Square Adj	0.384438
Root Mean Square Error	2.102894
Mean of Response	13.93217
Observations (or Sum Wgts)	23

Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-14.77154	14.67159	-1.01	0.3267
ALTITUD	0.0070805	0.002671	2.65	0,0158*
BIO 10	0.105965	0.05247	2.02	0.0578
log10 BIO14	-0.579261	1.039744	-0.56	0.584

Tabla 6. Regresión lineal entre el tamaño de los individuos (longitud rostro-cloacal) y la Frecuencia Fundamental a la que emiten el canto de anuncio (Ff).

Linear Fit				
Ft= 4668,9607- 124,41413*Svl (mm)				
Summary of Fit				
R Square	0.807829			
R Square Adj	0.805541			
Root Mean Square Error	131.7719			
Mean of Response	2385.585			
Observations (or Sum Wgts)	86			
Analysis of Variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	6131359.5	6131359	353.1111
Error	84	1458561.3	17364	Prob>F
C.Total	85	7589920.7		<,0001*
Parameter Estimates				
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	4668.961	122.3407	38.16	<,0001*
Svl (mm)	-124.4141	6.620854	-18.79	<,0001*

Tabla 7. Regresión lineal entre la altitud a la que se ubican las poblaciones y el tamaño de los individuos (longitud rostro-cloacal) de las especies del clado *Epipedobates*.

Linear Fit				
Svl(mm)= 16,215447-0,0028204*Altitud				
Summary of Fit				
R Square	0.415193			
R Square Adj	0.387345			
Root Mean Square Error	1.713941			
Mean of Response	18.18565			
Observations (or Sum Wgts)	23			
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	43.79732	43.7973	14.9093
Error	21	61.68945	2.9376	Prob>F
C.Total	22	105.48677		0,0009*

Figura 1. Filogenia molecular del clado *Epipedobates*. (Santos *et al.* 2009).



Figura 2. Mapa del Ecuador con la distribución de las poblaciones de las cinco especies del clado *Epipedobates*.

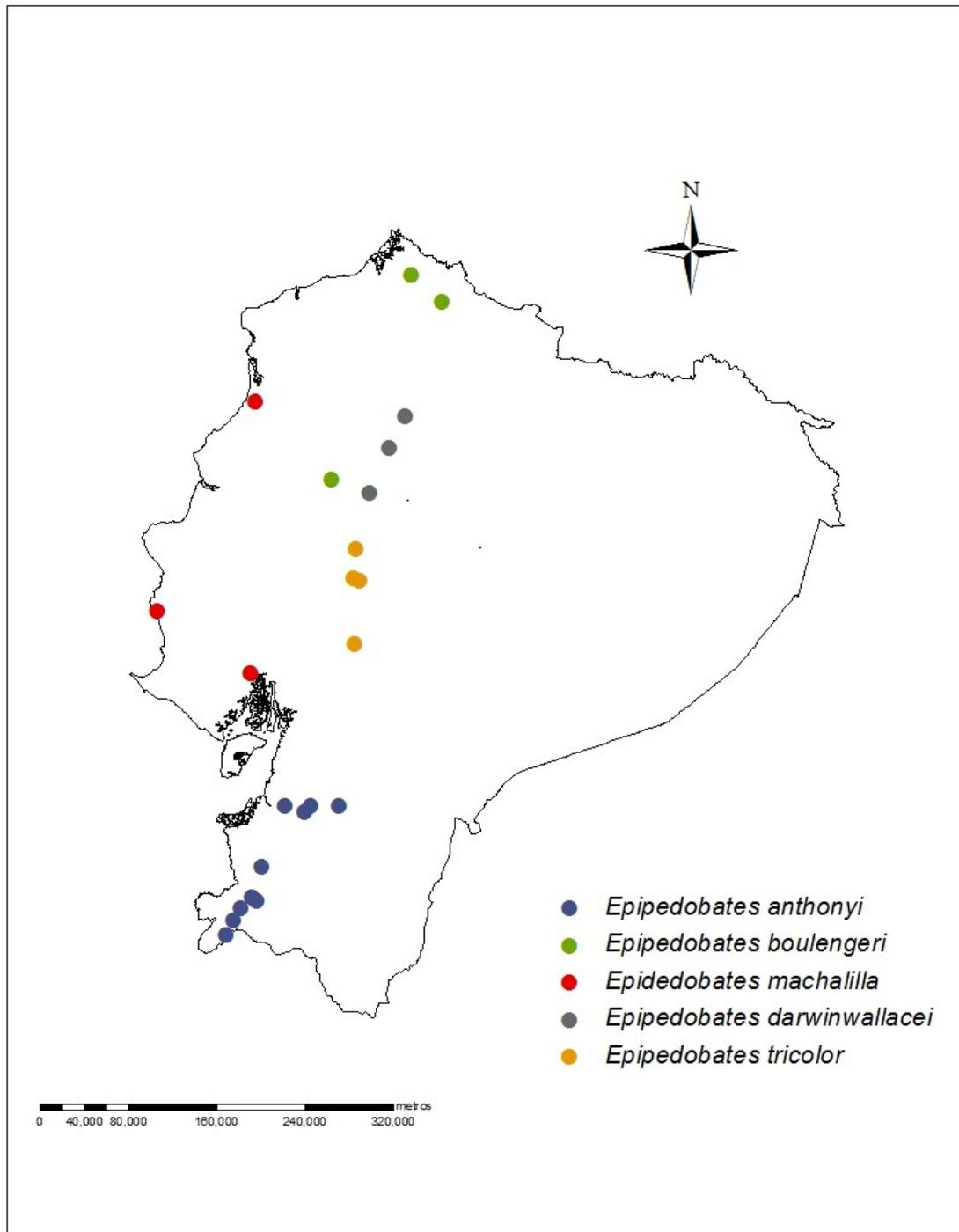


Figura 3. Individuos de cinco especies de *Epipedobates*. (A) *Epipedobates machalilla* (Río Nalpe), (B) *E. anthonyi* (Progreso), (C) *E. boulengeri* (San Francisco), (D) *E. tricolor* (Moraspungo), (E) *E. darwinwallacei* (Mindo).





Figura 4. Análisis de Componentes Principales (ACP) de variables acústicas del canto de anuncio en especies del clado *Epipedobates*.

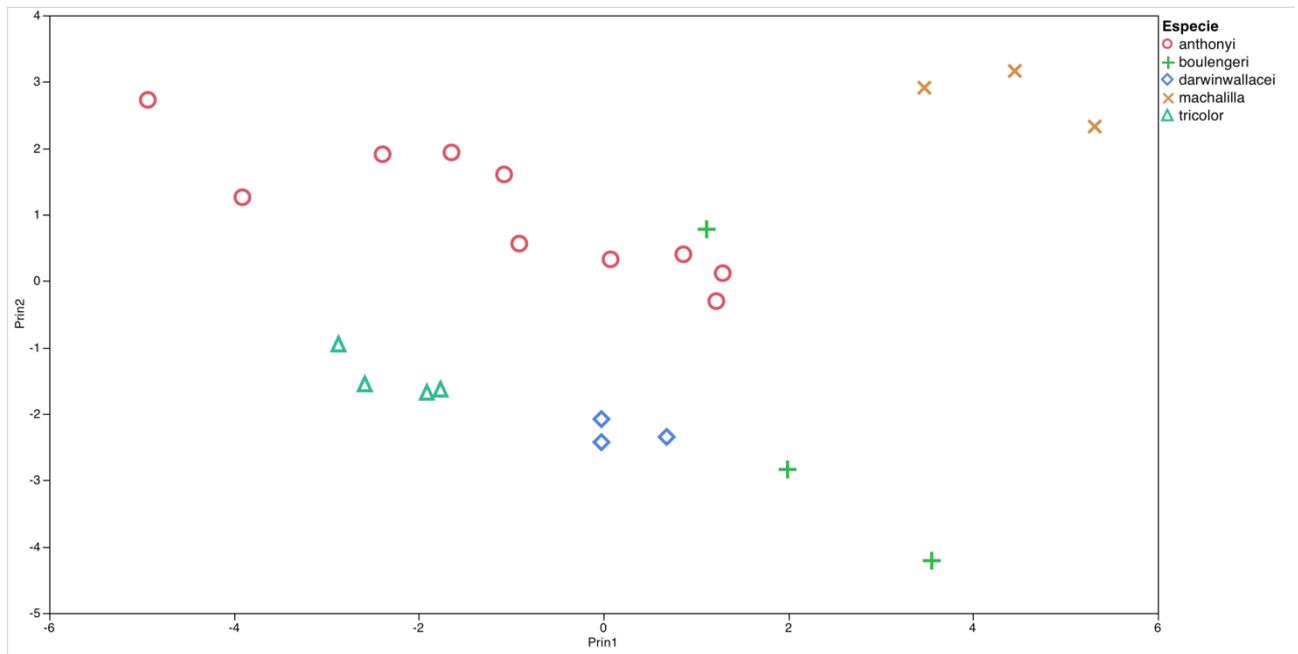


Figura 5. Análisis de Componentes Principales (ACP) de variables acústicas del canto de anuncio en la especie de *Epipedobates anthonyi*.

Bivariate Fit of Prin2 By Prin1

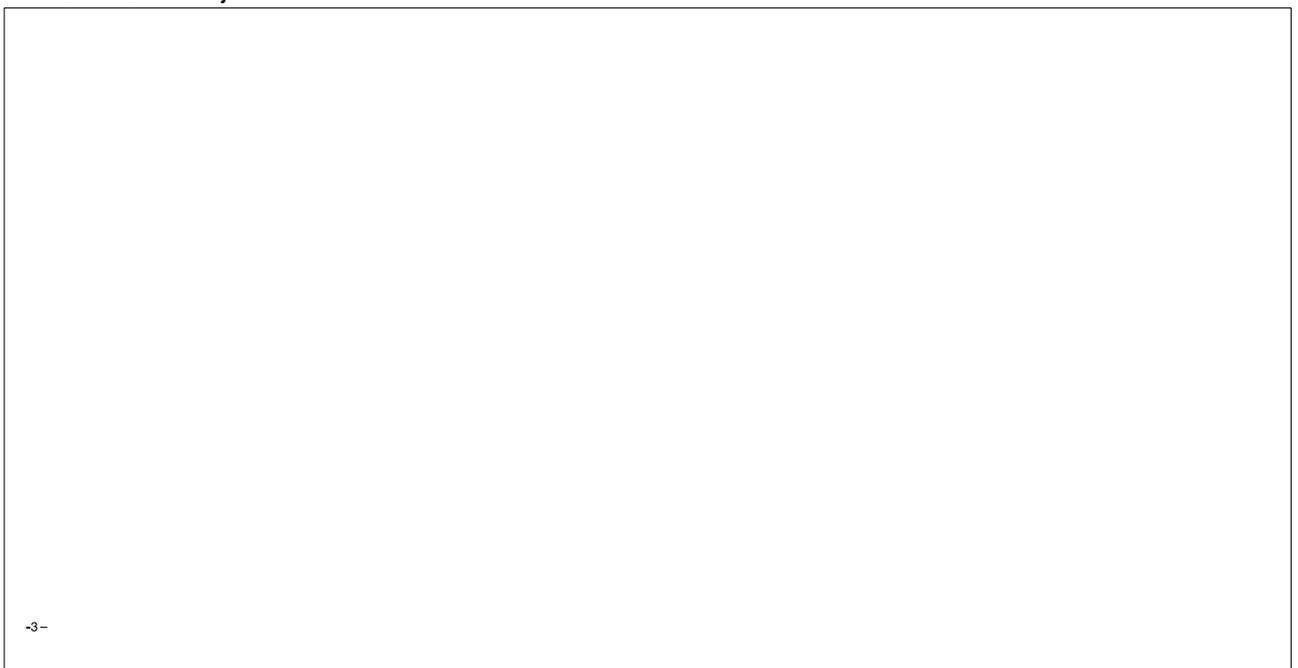


Figura 6. Análisis de Componentes Principales (ACP) de variables ambientales para especies del clado *Epipedobates*.

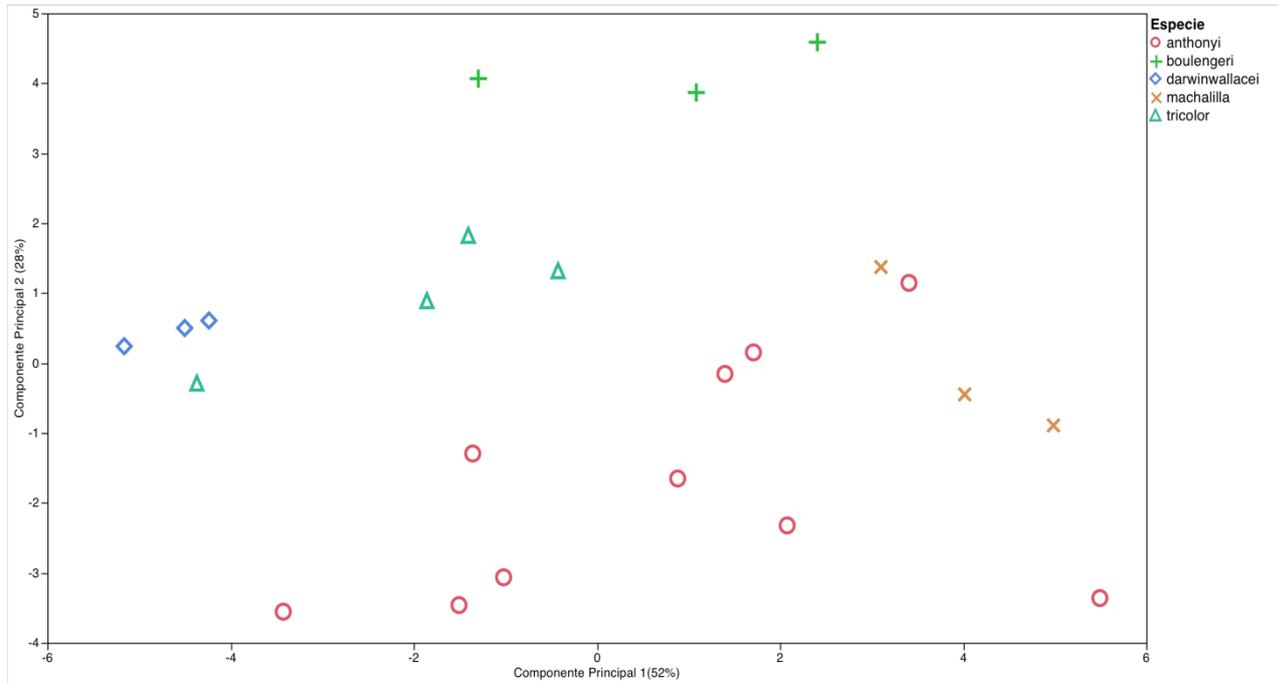


Figura 7. Regresión lineal entre el tamaño de los individuos (longitud rostro-cloacal) de especies del clado *Epipedobates* y la Frecuencia Fundamental emitida en el canto de anuncio.

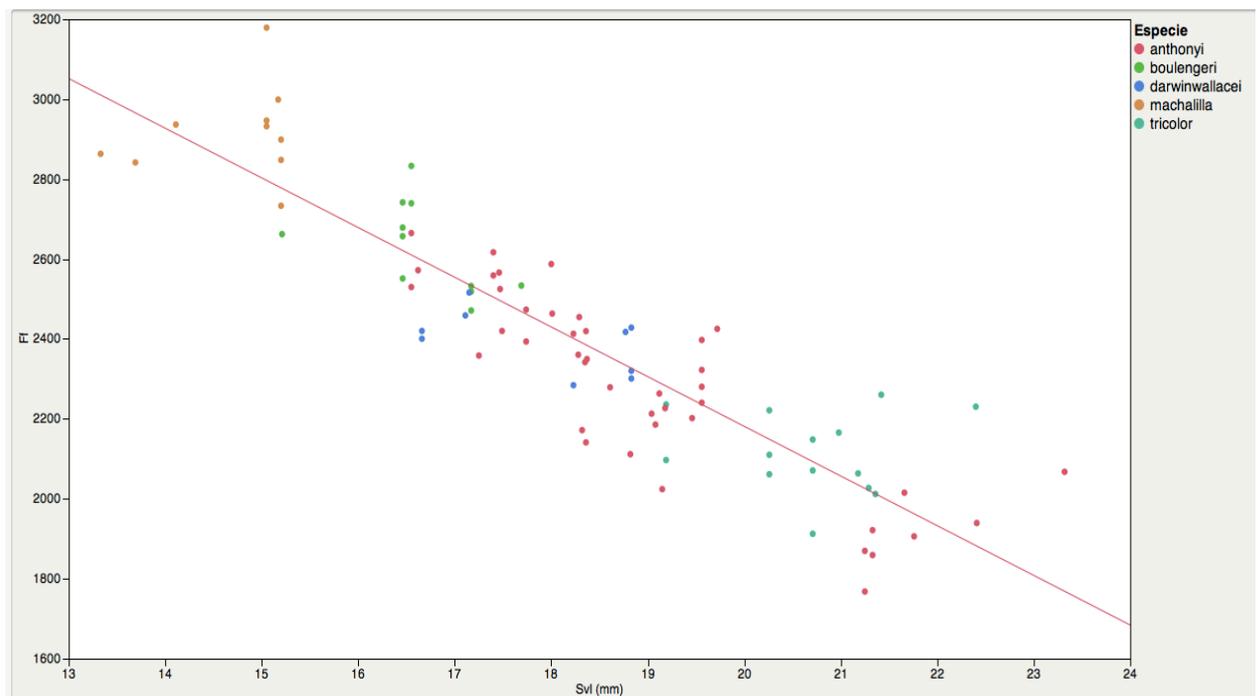
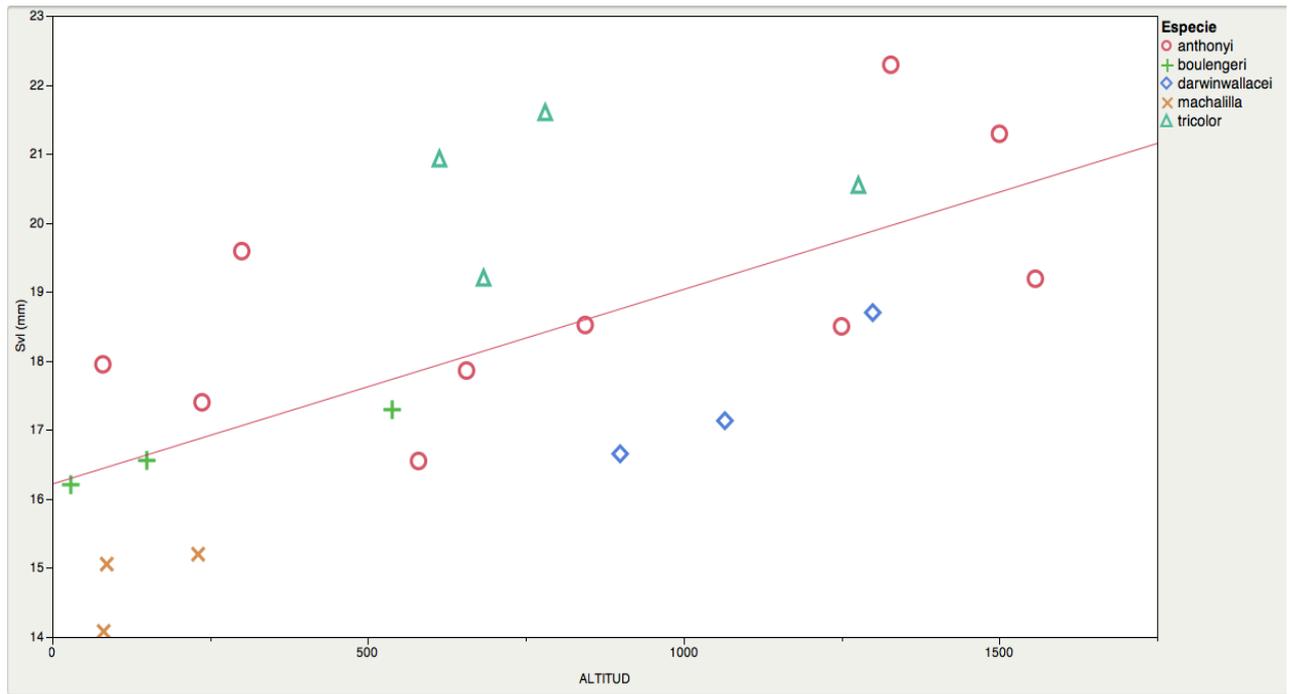


Figura 8. Regresión lineal entre la altitud a la que se ubican las poblaciones el tamaño de los individuos (longitud rostro-cloacal) de las especies del clado *Epipedobates*.



LITERATURA CITADA

- Acosta-Buenaño, N. A. 2002. Vocalización en 9 especies de *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae) del Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Adams, D. C. y Church, J. O. 2007. Amphibians do not follow Bergmann's rule. *Evolution* 62(2):413–420
- Amézquita, A., Hödl, W., Lima, A., Castellanos, L., Erdtmann, L. y Carmozina de Araújo, M. 2006. Masking interference and the evolution of the acoustic communication system in the Amazonian Dendrobatid frog *Allobates femoralis*. *Evolution* 60(9):1874–1887.
- Amézquita, A., Lima, A., Jehle, R., Castellanos, L., Ramos, O., Crawford, A., Gasser, H. y Hödl, W. 2009. Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 98:826–838.
- Amphibiaweb: Information on amphibian biology and conservation. [http://amphibiaweb.org/lists/Dendrobatidae.shtml]. 2011. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: 2011).
- Balkenhol, N., Waits, L. y Dezzani, R. 2009. Statistical approaches in landscape genetics: and evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography* 32:818–830
- Baquero-Rivadeneira, M. 2006. Evolución del canto de anuncio en el clado tricolor. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Bee, M., Cook, J., Love, E., O'Bryan L., Pettitt, B., Schrode, K. y Vélez, A. 2010. Assessing acoustic signal variability and the potential for sexual selection and social recognition in boreal chorus frogs (*Pseudacris maculata*). *Ethology* 116:564–576.
- Bernal, X., Page, R. A., Rand, A. S. y Ryan, M. J. 2007. Cues for Eavesdroppers: Do Frog Calls Indicate Prey Density and Quality?. *The American Naturalist* 169(3):409–415.
- Blackburn, D. C. y Wake, D. B. 2011. Class Amphibia Gray, 1825. In: Zhang Z.-Q (ed) *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 3148:38–54.
- Boeckle, M., Preininger, D. y Hödl, W. 2009. Communication in Noisy Environments i: Acoustic Signals of *Staurois latopalmatus* Boulenger 1887. *Herpetologica* 65(2):154–165.
- Bosch, J. y de la Riva, I. 2004. Are frog calls modulated by environment? An analysis with anuran species from Bolivia. *Canadian Journal of Zoology* 82:880–884.
- Brooke, N. P., Alford, R. A. y Schwarzkopf, L. 2000. Environmental and social factors influence chorusing behaviour in a tropical frog: examining various temporal and spatial scales. *Behavioral Ecological Sociobiology* 49:79–87.
- Campbell, P., Pasch, B., Pino, J., Crino, O., Phillips, M. y Phelps, S. 2010. Geographic variation in the songs of neotropical singing mice: testing the relative importances of drift and local adaptation. *Evolution* 64(7):1955–1972.

- Cannatella, D. C., Hills, D. M., Chippindale, P. T., Weigt, L., Rand, A. S. y Ryan, M. 1998. Phylogeny of Frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group with an examination of Data Incongruence. *Systematic Biology* 47(2):311–335.
- Castellano, S. y C. Giacoma. 2000. Morphometric and advertisement call geographic variation in polyploidy green toads. *Biological Journal of the Linnean Society* 70:341–360.
- Castillo-Trenn, C. y Coloma, L. A. 2008. Notes on behaviour and reproduction in captive *Allobates kingsburyi* (Anura: Dendrobatidae), with comments on evolution of reproductive amplexus. *Int. Zoo Yb.* (2008) 42:1–13.
- Charif, R.A., C. W. Clark y K. M. Fristrup. 2004. Raven 1.2 User's Manual. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, New York, U.S.A.
- Cisneros-Heredia, D. y Yáñez-Muñoz M. 2010. A new poison frog of the genus *Epipedobates* (Dendrobatoidea: Dendrobatidae) from the north-western Andes of Ecuador. *Avances* 3:B83–B86.
- Clemente-Carvalho, R. B. G., Monteiro, L. R., Bonato, V., Rocha, H. S., Pereira, G. R., Oliveira, D. F., Lopes, R. T., Haddad, C. F. B., Martins, E. G. y Dos Reis, S. F. 2008. Geographic Variation in Cranial Shape in the Pumpkin Toadlet (*Brachycephalus ephippium*): A Geometric Analysis. *Journal of Herpetology* 42(1):176–185.
- Cvetkovic, D., Tomasevic N., Ficetola, G.F., Crnobrnja-Isailovic, J. y Miaud, C. 2008. Bergmanns rule in amphibians: combining demographic and ecological parameters to explain body size variation among populations in the common toad *Bufo bufo*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 504.
- Duellman, W. y Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. The Johns Hopkins University Press, London, United Kingdom.
- Erdtmann, L. y Amézquita, A. 2009. Differential Evolution of advertisement call traits in dart-poison frogs (Anura: Dendrobatidae). *Ethology* 115:801–811.
- Forsman, A. y Hagman M. 2006. Calling is an honest indicator of paternal genetic quality in poison frogs. *Evolution* 60(10):2148–2157.
- Forstmeier, W., Burger, C., Temnow, K., Derégnaucourt, S. 2009. The genetic basis of zebra finch vocalizations. *Evolution* 63(8):2114–2130.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., de Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. & Wheeler, W.C. 2006. The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297:1–370.
- Funk, W.C., Cannatella, D.C., Ryan, M.J. 2009. Genetic divergence is more tightly related to call variation than landscape features in the Amazonian frogs *Physalaemus petersi* and *P. freibergi*. *Journal of Evolutionary Biology*, 22:1839–1853.
- Gasser, H., Amézquita, A., Hödl, W. 2009. Who is calling? Intraspecific call variation in the anrobatid frog *Allobates femoralis*. *Ethology* 115:596–607.
- Gergus, E., Sullivan, B. y Malmos, K. 1997. Call Variation in the *Bufo microscaphus* Complex:

Implications for Species Boundaries and the Evolution of Mate Recognition. *Ethology* 103(12):979–989.

Graham, C. H., Ron, S. R., Santos, J. C., Schneider, C. J. y Mortiz, C. 2004. *Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs*. *Evolution* 58:1781–1793.

Heyer, W. R., M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek y M. S. Foster. 1994. *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, U.S.A.

Höbel, G. y Gerhardt, H. 2009. Reproductive character displacement in the acoustic Communication system of green tree frogs (*Hyla cinerea*). *Evolution* 57(4):894–904.

Jang, Y., Hye Hahm, E., Lee, H-J., Park, S., Won, Y-J. y Choe, J. C. 2011. Geographic variation in advertisement calls in a tree frog species: Gene flow and selection hypotheses. *PloS ONE* 6(8):e23297.

Kime, N., Turner, W. y Ryan, M. 2000. The transmission of advertisement calls in Central American frogs. *Behavioral Ecology* 11(1):71–83.

La Marca, E. 2005. Estatus de poblaciones de ranas de la familia Dendrobatidae (Amphibia: Anura) en sus localidades tipo en los Andes de Venezuela. *Herpetotropicos* 2(2):73–86.

Lehr, E. y Catenazzi, A. 2009. A new species of *Minute noblella* (Anura: Strabomantidae) from Southern Peru: The Smalles Frog of the Andes. *Copeia* (1):148–156.

Liao, J. C y Liu N, F. 2008. Altitudinal variations of acoustic organs in anurans: A case study from China. *Italian Journal of Zoology* 75(2):125–134.

Liao, W. y Lu, X. 2012. Adult body size = $f(\text{inicial size} + \text{growth rate} \times \text{age})$: explaining the proximate cause of Bergman's cline in a toad along altitudinal gradients. *Evolutionary Ecology* 26:579–590.

Lougheed, S., Austin, J., Bogart, F., Boag, P. Y Chek, A. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology* 6:23.

Lötters, S., Reichle, S. y Jungfer, K. 2003. Advertisement calls of Neotropical Poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae) of the genera *Colostethus*, *Dendrobates* and *Epipedobates*, with notes on dendrobatid call classification. *Journal of Natural History* 37:1899–1911.

Ma, X., Lu, X. y Meril, J. 2009. Altitudinal decline of body size in a Tibetan frog. *Journal of Zoology* 279:364–371.

Marshall, V. y Gerhardt, H. 2010. A precedence effect underlies preferences for calls with leading pulses in the grey treefrog, *Hyla versicolor*. *Animal Behavior* 80:139–145.

Meenderink, S. W. y Van Dijk P. 2006. Temperature Dependence of Anuran Distortion Product Otoacoustic Emissions. *JARO* 7:246–252.

Meedenrink, S. W., Kits, M. y Narins, P. 2010. Frequency matching of vocalizations to inner-ear sensitivity along an altitudinal gradient in the coqui frog. *Biology Letters* 6:278–281.

- Montanarin, A., Kaefer, I. L. y Lima, A. P. 2011. Courtship and mating behaviour of the brilliant thighed frog *Allobates femoralis* from Central Amazonia: implications for the study of a species complex. *Ecology & Evolution* 23(2):141–150.
- Moriarty Lemmon, E., Lemmon, A. y Cannatella, D. 2007. Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). *Evolution* 61(9):2086–2103.
- Moriarty, E. 2009. Diversification of conspecific signals in sympatry: Geographic overlap drives multidimensional reproductive character displacement in frogs. *Evolution* 63(5):1155–1170.
- Nicholls, J., Austin, J., Moritz, C. Y Goldizen, A. 2006. Genetic population structure and call variation in a passerine bird, the satin bowerbird, *Ptilonorhynchus violaceus*. *Evolution* 60(6): 1279–1290.
- Penna, M. y Solís, R. 1998. Frog call intensities and sound propagation in the South American temperate forest region. *Behavior Ecology and Sociobiology* 42(6):371–381.
- Penna, M. 2004. Amplification and spectral shifts of vocalizations inside burrows of the frog *Eupsophus calcaratus* (Leptodactylidae). *Journal of Acoustic Society of America* 116(2).
- Peter M. Narins and Sheila L. Smith. Clinal variation in anuran advertisement calls: basis for acoustic isolation? *Behavioral Ecology and Sociobiology* (1986) 19:135–141.
- Pounds, A. J., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, P. L., Foster, N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S., Sánchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J. y Young B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature Publishing Group* 439(12):161–167.
- Pröhl, H., Koshy, R., Mueller, U., Rand, A. S., y Ryan, M. 2006. Geographic variation of genetic and behavioral traits in Northern and Southern túngara frogs. *Evolution* 60(8):1669–1679.
- Ptacek, M. 2000. The role of mating preferences in shaping interspecific divergence in mating signals in vertebrates. *Behavioral Processes* 51:111–134.
- Richards-Zawacki, C. y Cummings, M. 2010. Intraspecific reproductive character displacement in a polymorphic poison dart frog, *Dendrobates pumilio*. *Evolution* 65(1):259–267.
- Ricci, A. 1994. Sound Effects v. 0.9.1 Corso De Gasperi, 45 10129. Torino, Italy.
- Ryan, M. J., Rand, A. S. y A. S., Weigt L. A. 1996. Allozyme and advertisement call variation in the Tungara Frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution* 50(6):2435–2453.
- Rödger, D., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Garner, T., Veith, M., Walker, S., Fisher, M. y Lötters, S. 2009. Global amphibian extinction risk assessment for the Panzootic Chytrid fungus. *Diversity* (1):52–66.
- Rojas, B., Amézquita, A. y Delgadillo A. 2006. Matching and symmetry in the frequency recognition curve of the poison frog *Epipedobates trivittatus*. *Ethology* 112:564–571.
- Ryan, M. 1988a. Energy, Calling and Selection. *American Zoologist* 28:885–898.

Ryan, M.J. 1988b. Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication (chapter twenty-eight). En: *The Evolution of the amphibian auditory system*. (B. Frittsch, J. Ryan, W. Wilczynski, T. Hethington, eds) pp. 638–677. John Wiley & Sons, Inc. New York, U.S.A.

Santos, J. C. 2002. Relaciones filogenéticas de *Colostethus bocagei* y *Epipedobates tricolor* (Anura: Dendrobatidae) inferidas de secuencias de genes mitocondriales 12S, 16S y citocromo b. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador, 152 pp.

Santos, J.C., L. A. Coloma, D. C. Cannatella. 2003. Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Science* 100(22):12792–12797.

Santos, J., Coloma L. A., Summers, K., Caldwell J., Ree, R. y Cannatella, D. 2009. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. *PLoS Biol* 7(3): e1000056. doi:10.1371/journal.pbio.1000056.

Schoffelen, R. L. M., Segenhout, A. J. M. y van Dijk, A. P. 2008. Mechanics of the exceptional anuran ear. *Journal of Comparative Physiology A* (2008) 194:417–428.

Seyfarth, R., Cheney, D., Bergman, T., Fischer, J., Zuberbühler, K. y Hammerschmidt, K. 2010. The central importances of information in studies of animal communication. *Animal Behavior* 80:3–8.

Sierra, R. 1999. Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia. Quito, Ecuador.

Wake, D. 2012. Facing extinction in real time. *Science* 335:1052–1053.

West-Eberhard, M. J. 1983. Sexual selection, social competition and speciation. *Quarterly Review of Biology* 58:155–183.

Wiens, J. J., Ackerly, D. D., Allen, A. P., Anacker, B. L., Buckley, L. B., Cornell, H. V., Damschen, E. I., Davies, T. J., Grytnes J-A., Harrison, S. P., Hawkins, B. A., Holt, R. D., McCain, C. M. y Stephens, P. R. 2010. Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters* 13:1310–1324.

Wiley R. H. y Richards D. G. 1978. Physical Constraints on Acoustic Communication in the Atmosphere: Implications for the Evolution of Animal Vocalizations. *Behavioral Ecological Sociobiology* 3:69–94.

Wilczynski, W., Keddy-Hector, A., Ryan, M. 1992. Call patterns and brasilian papilla tuning in cricket frogs. I. Differences among populations and between sexes. *Brain Behavior* 39:229–237.

Wong, B., Cowling, A. N., Cunningham, R. B. Donnelly, C. F. y Cooper, P. D. 2004. Do temperature and social environment interact to affect call rate in frogs (*Crinia signifera*)?. *Austral Ecology* 29:209–214 .

Wycherley, J., Doran, S. y Beebee, T. 2002. Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biological Journal of the Linnean Society* 77:355–365.

APÉNDICE 1. Especies y localidades estudiadas en la presente investigación.

Epipedobates anthonyi (Figura 2)

En la provincia del Azuay, en sitios cercanos a la vía principal que conecta a Cuenca con Machala cerca a Santa Isabel: S 3.267466°, W 79.301700° (~1328msnm); Sarayunga: S 3.314306°, W 79.580694° (~1500msnm); y Santa Marta: S 3.272305°, W 79.527389° (~300msnm). Siguiendo la misma vía, Santa Isabel-Machala, pero en la provincia de El Oro, se hizo un colecta en El Progreso: S 3.272245°, W 79.743260° (~80msnm); y tomando una vía hacia el sur se realizó otra colecta en Marcabellí: S 3.764555°, W 79.925861° (~580msnm). En la Provincia de Loja se hizo un recorrido desde Zapotillo y en el sitio de menor altitud tomando la vía al Norte hacia Alamor. Las colectas se realizaron a 4Km entre Zapotillo y Pindal: S 4.330790°, W 80.220850° (~237msnm); a 15Km entre Zapotillo y Pindal S 4.208250°, W 80.162620° (~656msnm); a 3Km entre Pindal y Alamor: S 4.107480°, W 80.098460° (~844msnm), a 2Km entre Alamor y Celica: S 4.018420°, W 80.004200° (~1250msnm); y a 10Km entre Alamor y Celica: S 4.051260°, W 79.971940° (~1557msnm).

Epipedobates boulengeri (Figura 2)

En la provincia de Imbabura se realizó una colecta en la localidad de Lita: N 0.8748, W 78.45380 (~538msnm). El sitio de colecta se encontró aproximadamente a 30 m de altura de la unión de los Ríos Lita y Mira. En la provincia de Esmeraldas se visitó la localidad de San Francisco: N 1.09438, W 78.70750 (~30msnm). Además se obtuvo grabaciones de individuos ubicados en Río Palenque en la provincia de Los Ríos: S 0.59134, W 79.36161 (~187msnm).

Epipedobates darwinwallacei (Figura 2)

Se realizaron grabaciones de *E. darwinwallacei* en dos localidades. La primera localidad fue Mindo (Pichincha): N 0.069722, W 78.7625 (~1300msnm) y la otra localidad la Unión del Toachi (Santo Domingo de los Tsáchilas) N 0.327778, W 78.885833 (~900msnm). Una localidad de colección fue en la vía Pucayacu-Sigchos en la Provincia de Cotopaxi: N 0.69549, W 79.04978 (~1066msnm).

Epipedobates machalilla (Figura 2)

Se realizó la búsqueda, grabación y colección de *Epipedobates machalilla* en dos localidades. La primera en la provincia de Manabí cercana al Río Nalpe: N 0.051667, W 79.974167 (~81msnm) y la segunda en la provincia del Guayas en la localidad de Cerro Blanco: S 2.180000, W 80.019722 (~86msnm).

Se obtuvo grabaciones de la localidad llamada Ayampe (Manabí) con las siguientes coordenadas: S 1.666667, W 80.783333 (~216msnm).

Epipedobates tricolor (Figura 2)

Para esta especie se realizaron las grabaciones en la provincia de Cotopaxi en Moraspungo: S 1.158611, W 78.15472 a aproximadamente 780msnm. Y en la provincia de Bolívar se colectó en tres localidades: Mulidiaguan: S 1.41973, W 79.12504 (~1310msnm), ChazoJuan: S 1.39997, W 79.18188 a 683 msnm y San José de Tambo: S 1.94058, W 79.16835 (~614msnm).

ANEXO 1. Parámetros acústicos utilizados para el análisis.

Las variables son: duración de la llamada (DL), notas por llamada (NL), duración de la nota al inicio del canto (Dni), duración de la nota en el medio del canto (Dnm), duración de la nota al final del canto (Dnf), duración de la nota media (Dn), duración del intervalo entre notas al inicio (Ini), duración del intervalo entre notas en el medio (Inm), duración del intervalo entre notas al final (Inf), duración media del intervalo entre notas (In), media de la duración relativa de la nota (Dr), media del intervalo relativo de la nota (Ir), notas por minuto (Nm), media del tiempo de subida de la nota (Ts), media de la distancia relativa de mayor amplitud (Mar), frecuencia fundamental al inicio del canto (Ffi), frecuencia fundamental en el medio (Ffm), frecuencia fundamental al final (Fff), frecuencia fundamental media de las notas (Ff), frecuencia dominante al inicio del canto (Fdi), frecuencia dominante en el medio (Fdm), frecuencia dominante al final (Fdf), media de la frecuencia dominante de las notas (Fd).

Las variables duración de la nota (Dn), duración del intervalo entre notas (In), y distancia relativa de mayor amplitud (Mar) son particularmente recomendadas para su uso por Acosta-Buenaño (2002), para disminuir el margen de error por las diferencias en el tiempo de arrastre de la cinta en la grabación y/o digitalización.

ANEXO 2. Variables ambientales utilizadas para el análisis.

El número total de variables obtenidas es de 19 y definidas de la siguiente manera. BIO1: Temperatura media anual; BIO2: Rango medio diario (media mensual, temperatura máxima – temperatura mínima); BIO3: Isotermalidad $(\text{BIO2}/\text{BIO7})(*100)$; BIO4: Temperatura estacional (Desviación estándar *100); BIO5: Temperatura en el mes más caliente; BIO6: Temperatura mínima en el mes más frío; BIO7: Rango de Temperatura anual (BIO5-BIO6); BIO8: Temperatura media en el cuarto anual más húmedo donde cada cuarto es un periodo de tres meses ($1/4$ de año); BIO9: Temperatura media en el cuarto anual más seco; BIO10: Temperatura media del cuarto anual más caliente; BIO11: Temperatura media en el cuarto anual más frío; BIO12: Precipitación anual; BIO13: Precipitación en el mes más húmedo; BIO14: Precipitación en el mes

más seco; BIO15: Precipitación estacional (coeficiente de variación); BIO16: Precipitación en el cuarto anual más húmedo; BIO17: Precipitación en el cuarto anual más seco; BIO18: Precipitación en el cuarto anual más caliente y BIO19: Precipitación en el cuarto más frío.

ANEXO 3. Variables acústicas del canto de anuncio de poblaciones del clado *Epipedobates*.

Género	Especie	Localidad	Identificación	DL (ms)	NL	Dn (inicio)	Dn (medio)	Dn (final)	Dn (ms)	In (inicio)
				() # individuos grabados	Duración de la llamada	Notas por llamada	Duración de la nota (2 primeras notas)	Duración de la nota (2 notas del medio del canto)	Duración de la nota (2 notas finales)	Duración de la nota (promedio 6 notas anteriores)
Epipedobates	anthonyi	2 Km Alamor-Celica	promedio (3)	4389,2222	80,8889	13,1667	19,3333	20,5000	17,6667	35,9444
Epipedobates	anthonyi	3 Km Pindal-Alamor	promedio (5)	3801,4000	82,0000	9,0333	19,2333	19,9667	16,0778	32,5667
Epipedobates	anthonyi	4 Km Zapotill-Pindal	promedio (6)	3993,8889	95,0833	8,0278	15,4444	16,0000	13,1574	32,8056
Epipedobates	anthonyi	10Km Alamor-Celica	promedio (5)	5389,4000	92,8000	10,2333	18,9333	19,4000	16,1889	40,2333
Epipedobates	anthonyi	15Km Zapotil-Pindal	promedio (5)	3903,0000	84,8000	9,1333	17,5333	17,1333	14,6000	38,2333
Epipedobates	anthonyi	El Progreso	promedio (3)	4429,6667	65,9444	9,4444	15,2222	16,9722	13,6204	46,3611
Epipedobates	anthonyi	Marcabellí	promedio (2)	3229,6667	68,3333	9,0833	16,7500	16,2500	14,0278	35,5000
Epipedobates	anthonyi	Santa Isabel	promedio (4)	3568,2500	50,9167	10,0833	22,5000	23,0833	18,5556	54,2917
Epipedobates	anthonyi	Santa Marta	promedio (4)	2916,4167	49,0000	10,0417	19,5000	21,7500	17,0972	43,9167
Epipedobates	anthonyi	Sarayunga	promedio (5)	3748,8000	63,8333	10,1167	19,8833	20,6000	16,8778	43,8000
Epipedobates	boulengeri	Lita	promedio (4)	4486,4167	63,4167	11,9167	15,4375	17,2083	14,8542	18,3750
Epipedobates	boulengeri	Río Palenque	promedio (2)	1703,4583	76,4583	5,3125	7,6667	8,9583	7,3125	13,1667
Epipedobates	boulengeri	San Francisco	promedio (5)	2090,8333	43,1667	9,9333	10,4500	11,9833	10,7889	11,5833
Epipedobates	machalilla	Río Ayampe	promedio (3)	7057,8889	112,3333	11,7778	17,8333	19,9444	16,5185	50,7778
Epipedobates	machalilla	Cerro Blanco	promedio (3)	6415,2222	89,8889	9,0833	15,3056	14,4722	12,9537	104,7500
Epipedobates	machalilla	Río Nalpe	promedio (4)	6048,5833	44,3333	11,7083	13,3333	13,6667	12,9028	204,7917
Epipedobates	darwinwallacei	Pucayacu-Sigchos	promedio (2)	2113,8333	64,8333	7,5000	11,7500	13,1667	10,8056	21,2500
Epipedobates	darwinwallacei	Mindo	promedio (5)	2352,6667	74,8000	7,6667	12,0000	11,6667	10,4444	20,8333
Epipedobates	darwinwallacei	U. Del Toachi	promedio (2)	2109,5000	73,1667	10,5000	13,5833	14,3333	12,8056	14,2500
Epipedobates	tricolor	ChazoJuan	promedio (2)	2126,0833	59,9167	8,5417	13,7500	15,2917	12,5278	22,6667
Epipedobates	tricolor	Moraspungo	promedio (3)	1874,4444	56,4444	11,3333	13,8333	15,6667	13,6111	17,8333
Epipedobates	tricolor	Mulidiaguan	promedio (4)	1591,4375	41,6042	11,8854	15,8021	17,2813	14,9896	22,7813
Epipedobates	tricolor	S. José Tamb-Chillan	promedio (5)	2392,4000	63,5333	8,2667	13,2333	14,6667	12,0556	25,3667

ANEXO 3. Continuación

Género	Especie	Localidad	In (medio)	In (fina)	In (ms)	Dr	Ir	Nm	Ts	Mar
			Duración del intervalo entre notas (2 notas del medio del canto)	Duración del intervalo entre notas (2 notas finales)	Intervalo entre notas (promedio 6 intervalos entre notas anteriores)	Duración relativa de la nota (Dn/DL)	Duración relativa del intervalo entre notas (In/DL)	Notas por minuto 6000/(Dn+In)	Tiempo de subida	
Epipedobates	anthonyi	2 Km Alamor-Celica	36,0556	43,5556	38,5185	0,0041	0,0089	1068,2182	7,8519	0,4450
Epipedobates	anthonyi	3 Km Pindal-Alamor	28,6000	32,8000	31,3222	0,0044	0,0085	1267,0485	6,6556	0,4116
Epipedobates	anthonyi	4 Km Zapotill-Pindal	26,8611	30,3750	30,0139	0,0034	0,0078	1391,4321	4,7731	0,3697
Epipedobates	anthonyi	10Km Alamor-Celica	40,0667	48,6000	42,9667	0,0031	0,0082	1018,1154	6,8889	0,4204
Epipedobates	anthonyi	15Km Zapotil-Pindal	29,1000	33,6667	33,6667	0,0038	0,0090	1249,0312	5,6222	0,3860
Epipedobates	anthonyi	El Progreso	33,3333	34,2778	38,0463	0,0036	0,0100	1296,4807	4,4907	0,3392
Epipedobates	anthonyi	Marcabelf	32,6667	38,3333	35,5000	0,0044	0,0115	1215,8786	4,3889	0,3039
Epipedobates	anthonyi	Santa Isabel	59,6667	61,5417	58,5000	0,0059	0,0212	836,3525	6,8889	0,3710
Epipedobates	anthonyi	Santa Marta	41,1667	47,5417	44,2083	0,0061	0,0160	984,3327	5,4722	0,3306
Epipedobates	anthonyi	Sarayunga	40,2667	46,6667	44,3833	0,0048	0,0127	1000,4734	6,7667	0,4021
Epipedobates	boulengeri	Lita	112,8542	20,0625	50,4306	0,0036	0,0127	973,2024	6,5556	0,4420
Epipedobates	boulengeri	Río Palenque	14,6458	15,8750	14,5625	0,0043	0,0086	2753,9436	2,0347	0,2880
Epipedobates	boulengeri	San Francisco	26,2333	15,5000	17,7722	0,0055	0,0095	2212,4763	3,6391	0,3352
Epipedobates	machalilla	Río Ayampe	47,2778	40,2778	46,1111	0,0024	0,0064	987,0495	4,0556	0,2613
Epipedobates	machalilla	Cerro Blanco	58,1389	48,8333	70,5741	0,0022	0,0113	784,5895	3,5000	0,2785
Epipedobates	machalilla	Río Nalpe	107,2917	53,2083	121,7639	0,0023	0,0199	628,4434	4,5139	0,3470
Epipedobates	darwinwallacei	Pucayacu-Sigchos	22,1667	24,1667	22,5278	0,0051	0,0107	1801,4075	2,7778	0,2640
Epipedobates	darwinwallacei	Mindo	20,0333	24,0667	21,6444	0,0045	0,0095	1878,4081	3,1113	0,3049
Epipedobates	darwinwallacei	U. Del Toachi	15,5833	19,5000	16,4444	0,0061	0,0078	2052,9128	4,5001	0,3394
Epipedobates	tricolor	ChazoJuan	23,3333	28,5000	24,8333	0,0061	0,0120	1607,4565	5,6389	0,4576
Epipedobates	tricolor	Moraspungo	20,0000	23,9444	20,5926	0,0074	0,0112	1756,7812	4,1296	0,3029
Epipedobates	tricolor	Mulidiaguan	23,8750	28,9896	25,2153	0,0098	0,0167	1583,6585	5,8057	0,3897
Epipedobates	tricolor	S. José Tamb-Chillan	25,0333	32,6000	27,6667	0,0053	0,0123	1521,2882	5,4224	0,4532

ANEXO 3. Continuación

Género	Especie	Localidad	Ff (inicio)	Ff (medio)	Ff (final)	Ff	Fd (inicio)	Fd (medio)	Fd (final)	Fd
			Frecuencia fundamental (2 primeras notas)	Frecuencia fundamental (2 notas del medio del canto)	Frecuencia fundamental (2 notas finales)	Frecuencia fundamental (promedio de las 6 notas anteriores)	Frecuencia dominante (2 primeras notas)	Frecuencia dominante (2 notas del medio del canto)	Frecuencia dominante (2 notas finales)	Frecuencia dominante (promedio de las 6 notas anteriores)
Epipedobates	anthonyi	2 Km Alamor-Celica	2060,9333	2191,0611	2172,4944	2141,4963	4074,0972	4298,2944	4269,7056	4214,0324
Epipedobates	anthonyi	3 Km Pindal-Alamor	2238,3100	2376,2567	2371,4400	2324,3833	4401,3017	4668,5417	4623,4233	4564,4222
Epipedobates	anthonyi	4 Km Zapotill-Pindal	2427,7236	2596,9861	2590,3611	2532,8903	4770,8063	5097,0875	5072,7403	4980,2113
Epipedobates	anthonyi	10Km Alamor-Celica	2134,3700	2226,1800	2202,4667	2185,8556	4177,7417	4396,5817	4353,1083	4309,1439
Epipedobates	anthonyi	15Km Zapotill-Pindal	2345,4600	2467,4867	2437,2333	2411,5567	4578,9517	4881,0050	4817,7183	4759,2250
Epipedobates	anthonyi	El Progreso	2356,1111	2581,6389	2574,5528	2487,2713	4751,2736	5086,6861	5073,8417	4946,5319
Epipedobates	anthonyi	Marcabellí	2581,7167	2629,9417	2578,8667	2597,3878	5096,8042	5186,3917	5111,8875	5131,1153
Epipedobates	anthonyi	Santa Isabel	1752,6146	1903,1875	1907,9625	1854,5882	3444,2573	3748,2167	3752,4021	3648,2920
Epipedobates	anthonyi	Santa Marta	1923,0750	2015,6667	2003,6917	1982,0522	3737,3667	3974,1104	3924,9854	3880,5310
Epipedobates	anthonyi	Sarayunga	2254,3417	2371,0583	2352,3567	2333,1722	4451,6067	4727,9742	4662,7267	4619,5919
Epipedobates	boulengeri	Lita	2446,5750	2529,3688	2565,8563	2513,9333	4937,1302	5097,6885	5138,2583	5057,6924
Epipedobates	boulengeri	Río Palenque	2729,4729	2816,3938	2812,8542	2786,2403	5406,5635	5589,1802	5536,1656	5510,6365
Epipedobates	boulengeri	San Francisco	2640,3917	2660,6800	2673,6633	2658,2450	5221,9575	5265,3242	5344,5908	5277,2908
Epipedobates	machalilla	Río Ayampe	2801,5889	2844,2000	2834,2167	2826,6685	5633,9083	5664,1083	5617,3111	5638,4426
Epipedobates	machalilla	Cerro Blanco	2901,4056	3057,5194	3098,6806	3019,2019	5798,7750	6121,7542	6148,5819	6023,0370
Epipedobates	machalilla	Río Nalpe	2842,5250	2912,4958	2975,1792	2910,0667	5659,9729	5863,1333	5965,9354	5829,6806
Epipedobates	darwinwallacei	Pucayacu-Sigchos	2468,3250	2498,0333	2496,1667	2487,5083	4702,6125	4919,7375	4851,1042	4824,4847
Epipedobates	darwinwallacei	Mindo	2288,2600	2412,3333	2350,2100	2350,2678	4501,1600	4744,0483	4639,4033	4628,2039
Epipedobates	darwinwallacei	U. Del Toachi	2358,2333	2445,6500	2426,9250	2410,2694	4654,4583	4854,8417	4771,5542	4760,2847
Epipedobates	tricolor	ChazoJuan	2075,0250	2188,4875	2235,8667	2166,4597	4090,0188	4316,3750	4245,2354	4217,2097
Epipedobates	tricolor	Morasungo	2155,5944	2265,3778	2235,4389	2218,8037	4170,5889	4401,5556	4381,2694	4317,8046
Epipedobates	tricolor	Mulidiaguan	2021,6646	2172,0615	2109,8865	2101,2042	3946,8094	4275,6745	4171,8776	4131,4538
Epipedobates	tricolor	S. José Tamb-Chillan	1989,1300	2082,9233	2064,3367	2044,4313	3941,4633	4096,4667	4007,5250	4015,1517

ANEXO 4. Variables ambientales de poblaciones del clado *Epipedobates*.

Género	Especie	Localidad	BIO1	BIO2	BIO3	BIO4	BIO5	BIO6	BIO7	BIO8	BIO9	BIO10
			Annual Mean Temperature	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))	Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)	Temperature Seasonality (standard deviation *100)	Max Temperature of Warmest Month	Min Temperature of Coldest Month	Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)	Mean Temperature of Wettest Quarter	Mean Temperature of Driest Quarter	Mean Temperature of Warmest Quarter
Epipedobates	anthonyi	2 Km Alamor-Celica	217000	122000	89000	185000	287000	150000	137000	218000	216000	218000
Epipedobates	anthonyi	3 Km Pindal-Alamor	230000	123000	89000	459000	298000	160000	138000	236000	225000	236000
Epipedobates	anthonyi	4 Km Zapotill-Pindal	248000	124000	79000	1255000	324000	168000	156000	262000	232000	263000
Epipedobates	anthonyi	10Km Alamor-Celica	193000	123000	87000	198000	266000	126000	140000	191000	194000	195000
Epipedobates	anthonyi	15Km Zapotill-Pindal	235000	125000	86000	721000	305000	160000	145000	243000	226000	243000
Epipedobates	anthonyi	El Progreso	247000	84000	72000	1067000	311000	195000	116000	257000	235000	260000
Epipedobates	anthonyi	Marcabelf	237000	112000	91000	297000	298000	176000	122000	240000	234000	240000
Epipedobates	anthonyi	Santa Isabel	211000	112000	88000	389000	278000	152000	126000	206000	213000	215000
Epipedobates	anthonyi	Santa Marta	204000	112000	87000	440000	273000	145000	128000	199000	208000	209000
Epipedobates	anthonyi	Sarayunga	236000	99000	86000	442000	296000	182000	114000	241000	231000	242000
Epipedobates	boulengeri	Lita	230000	84000	89000	266000	279000	185000	94000	233000	229000	233000
Epipedobates	boulengeri	Río Palenque	243000	88000	76000	835000	303000	188000	115000	254000	234000	254000
Epipedobates	boulengeri	San Francisco	258000	84000	87000	338000	308000	212000	96000	261000	255000	263000
Epipedobates	machalilla	Río Ayampe	245000	74000	69000	1141000	299000	192000	107000	259000	231000	260000
Epipedobates	machalilla	Cerro Blanco	254000	94000	78000	905000	312000	192000	120000	263000	245000	264000
Epipedobates	machalilla	Río Nalpe	247000	77000	77000	691000	300000	201000	99000	254000	240000	256000
Epipedobates	darwinwallacei	Pucayacu-Sigchos	188000	82000	82000	309000	237000	137000	100000	192000	186000	192000
Epipedobates	darwinwallacei	Mindo	186000	98000	87000	237000	241000	129000	112000	189000	184000	189000
Epipedobates	darwinwallacei	U. Del Toachi	192000	90000	86000	325000	242000	138000	104000	195000	189000	196000
Epipedobates	tricolor	ChazoJuan	211000	82000	80000	566000	261000	159000	102000	218000	205000	218000
Epipedobates	tricolor	Moraspungo	218000	82000	78000	669000	270000	166000	104000	227000	211000	227000
Epipedobates	tricolor	Mulidiaguan	188000	80000	80000	298000	237000	138000	99000	192000	185000	192000
Epipedobates	tricolor	S. José Tamb-Chillan	224000	88000	80000	745000	278000	168000	110000	233000	215000	233000

ANEXO 4. Continuación

Género	Especie	Localidad	BIO11	BIO12	BIO13	BIO14	BIO15	BIO16	BIO17	BIO18	BIO19
			Mean Temperature of Coldest Quarter	Annual Precipitation	Precipitation of Wettest Month	Precipitation of Driest Month	Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)	Precipitation of Wettest Quarter	Precipitation of Driest Quarter	Precipitation of Warmest Quarter	Precipitation of Coldest Quarter
Epipedobates	anthonyi	2 Km Alamor-Celica	214000	1590000	321000	5000	94000	917000	21000	917000	162000
Epipedobates	anthonyi	3 Km Pindal-Alamor	224000	1139000	302000	2000	113000	771000	14000	771000	41000
Epipedobates	anthonyi	4 Km Zapotill-Pindal	232000	501000	240000	0	164000	430000	1000	387000	1000
Epipedobates	anthonyi	10Km Alamor-Celica	190000	1373000	287000	2000	97000	806000	13000	40000	795000
Epipedobates	anthonyi	15Km Zapotil-Pindal	225000	836000	269000	1000	124000	609000	7000	579000	23000
Epipedobates	anthonyi	El Progreso	234000	906000	173000	26000	68000	463000	90000	443000	96000
Epipedobates	anthonyi	Marcabelí	234000	1287000	268000	7000	94000	776000	33000	776000	55000
Epipedobates	anthonyi	Santa Isabel	205000	531000	105000	7000	69000	263000	30000	31000	217000
Epipedobates	anthonyi	Santa Marta	198000	729000	143000	3000	88000	398000	17000	20000	384000
Epipedobates	anthonyi	Sarayunga	231000	1001000	180000	17000	65000	474000	80000	388000	80000
Epipedobates	boulengeri	Lita	227000	3365000	389000	122000	28000	1068000	499000	1068000	949000
Epipedobates	boulengeri	Río Palenque	234000	2662000	502000	37000	85000	1468000	127000	1468000	207000
Epipedobates	boulengeri	San Francisco	255000	2508000	298000	117000	28000	847000	416000	836000	525000
Epipedobates	machalilla	Río Ayampe	231000	317000	74000	8000	84000	190000	34000	168000	34000
Epipedobates	machalilla	Cerro Blanco	242000	775000	191000	1000	120000	552000	3000	520000	9000
Epipedobates	machalilla	Río Nalpe	239000	1131000	233000	13000	88000	654000	48000	638000	68000
Epipedobates	darwinwallacei	Pucayacu-Sigchos	185000	2321000	407000	38000	76000	1172000	140000	1002000	169000
Epipedobates	darwinwallacei	Mindo	184000	2400000	390000	61000	58000	1073000	238000	1002000	264000
Epipedobates	darwinwallacei	U. Del Toachi	189000	2321000	391000	54000	68000	1107000	179000	987000	200000
Epipedobates	tricolor	ChazoJuan	204000	1924000	400000	20000	88000	1104000	78000	1104000	115000
Epipedobates	tricolor	Moraspungo	210000	2214000	444000	28000	84000	1223000	102000	1223000	164000
Epipedobates	tricolor	Mulidiaguan	185000	1988000	372000	23000	82000	1067000	97000	892000	129000
Epipedobates	tricolor	S. José Tamb-Chillan	215000	1952000	417000	19000	93000	1146000	74000	1146000	74000