

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación morfológica y genética del complejo de
especies *Pristimantis verecundus* (Anura: Strabomantidae)
Proyecto de Investigación**

Edgar Antonio Pillajo Sigcho

Biología

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Licenciatura en Biología, concentración en
Microbiología

Quito, 19 de julio de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación morfológica y genética del complejo de *Pristimantis verecundus*
(Anura: Strabomantidae)**

Edgar Antonio Pillajo Sigcho

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Juan Manuel Guayasamín, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 19 de julio de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Edgar Antonio Pillajo Sigcho

Código:

00123377

Cédula de Identidad:

1719104976

Lugar y fecha:

Quito, 19 de julio de 2019

RESUMEN

La diversidad críptica en los anfibios es inmensa en la mayoría de los ecosistemas neotropicales. Esta diversidad se ve potencialmente amplificada en zonas topográficamente complejas con los Andes. Bajo este contexto, este estudio analiza la morfología y genética de una especie de cutín (*Pristimantis verecundus*) para determinar si contienen o no múltiples linajes evolutivos. Los resultados demuestran que, efectivamente, *P. verecundus* es un complejo de especies que requiere una subdivisión taxonómica.

Palabras clave: Diversificación, diversidad genética, barreras geográficas, elevación, *Pristimantis verecundus*.

ABSTRACT

The cryptic diversity in amphibians is immense in most Neotropical ecosystems. This diversity is potentially amplified in topographically complex zones with the Andes. Under this context, this study analyzes the morphology and genetics of a cutin species (*Pristimantis verecundus*) to determine whether or not they contain multiple evolutionary lineages. The results show that, indeed, *P. verecundus* is a complex of species that requires a taxonomic subdivision.

Key words: Diversification, genetic diversity, geographical barriers, elevation, *Pristimantis verecundus*.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS.....	10
MÉTODOS	12
<i>Morfología</i>	<i>12</i>
<i>Extracción de adn y pcr para el gen 16s rrna</i>	<i>13</i>
<i>Análisis filogenéticos</i>	<i>14</i>
RESULTADOS	15
<i>Morfología</i>	<i>15</i>
<i>Análisis filogenéticos</i>	<i>15</i>
DISCUSIÓN	16
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
TABLAS.....	24
FIGURAS.....	27
ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Morfometría (en mm) del holotipo (IavH 1834), parapototipos y especímenes adicionales del complejo de especies reconocido como *Pristimantis verecundus*.....24
- Tabla 2.** Distancias genéticas no corregidas en PAUP entre los diferentes clados.....26

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Análisis de componente principal (PCA) de morfometría con las ocho variables medidas de los especímenes de estudio, incluyendo el holotipo y paratopotipo (La Planada).....27
- Figura 2.** Proporción de varianza acumulada en los componentes principales del PCA.....28
- Figura 3.** Distribución geográfica de los especímenes del área de estudio.....29
- Figura 4.** A, B, *Pristimantis verecundus*, holotipo, IND-AN 1834, en alcohol (Reserva Natural la Planada, Colombia, 1780msnm), C, D, JMG0675 (Carchi: Vía San Lorenzo, 23166msn); E, F, DHMECH 14006 (Carchi: El Pailón, 1495msnm); G, H, MZUTI 2114 (Pichincha, Séptimo Paraíso, 1599msnm).....31
- Figura 5.** Árbol de máxima verosimilitud de *Pristimantis*, inferido del gen mitocondrial 16s rRNA. Los distintos colores muestran los diferentes clados obtenidos dentro del complejo de especies de *Pristimantis verecundus*.32
- Figura 6.** Relaciones evolutivas entre las poblaciones que actualmente forman parte del complejo *Pristimantis verecundus*.33

INTRODUCCIÓN

El neotrópico es la región que más especies de anfibios tiene a nivel mundial (Duellman, 1999; Frost, 2019). De los 10 países con mayor diversidad, Ecuador se encuentra en el cuarto lugar teniendo además la mayor riqueza por unidad de área (Centro Jambatu, 2017). Acorde a los registros del Centro Jambatu (2017) se han registrado para Ecuador un total de 597 especies de anfibios de las cuales 210 pertenecen al género *Pristimantis* (2017).

Hasta el año 2008, la mayoría de las especies ecuatorianas que ahora forman parte del género *Pristimantis* estaban incluidas en el género *Eleutherodactylus* (véase Lynch y Duellman, 1997). Sin embargo, una serie de estudios moleculares han reorganizado la taxonomía de estos anuros (Heinicke *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Padial *et al.*, 2014). *Pristimantis* se caracteriza por tener desarrollo directo sin pasar por una fase larvaria acuática, lo que le permite vivir y reproducirse en cualquier ambiente con algo de humedad (González, *et al.*, 2011). Su radiación se distribuye a lo largo de las cordilleras montañosas donde hay alta rotación de hábitats y variaciones en las presiones selectivas en cortas distancias dado por la compleja orografía y los distintos cambios de clima (Terán y Guayasamin, 2010; Gonzales, *et al.*, 2011).

La complejidad del género *Pristimantis* también se evidencia en muchas de sus especies, existiendo una diversidad críptica que suele develarse gracias a técnicas moleculares y acústicas (véase Hutter y Guayasamin 2015; Guayasamin *et al.*, 2017). El presente estudio se enfoca en *Pristimantis verecundus* (Lynch y Burrowes 1990). Esta especie se caracteriza por sus tubérculos cónicos en el párpado superior, pliegues dorso laterales cortos que llegan hasta el sacro, piel granular en el vientre, pliegue discoidal dorso lateral, anillo timpánico visible, hocico subacuminado en vista dorsal, odontóforos vomerinos, dorso verrugoso, talón

y tarso (Lynch y Burrowes 1990). En cuanto a caracteres sexuales, los machos poseen sacos vocales y carecen de almohadillas nupciales (Lynch y Duellman, 1997).

Pristimantis verecundus ha registrado en zonas occidentales de los Andes, desde el sur de Colombia, departamento de Nariño hasta el norte de Ecuador en las provincias de Carchi, Esmeraldas, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi y Santo Domingo de los Tsáchilas, entre 1241 a 2070 msnm (Lynch y Duellman, 1990, 1997).

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza-UICN (2018), esta especie se encuentra en estado Vulnerable, debido a la deforestación y desarrollo agrícola causando la pérdida de su hábitat. Es importante mencionar que varias especies de *Pristimantis* son susceptibles a decaimiento poblacional a causa de extremos cambios climáticos y, potencialmente, la quitridiomycosis, por lo cual, al estudiar dichas especies se sugiere un seguimiento minucioso (Frenkel, *et al.*, 2014).

El evaluar la diversidad críptica en una especie requiere de marcadores genéticos que tengan una evolución rápido, permitiendo de esta manera identificar a las poblaciones que, potencialmente, han divergido independientemente. Entre los marcadores moleculares más utilizados para este tipo de estudios se encuentra el gen 16S rRNA, el cual es un marcador mitocondrial que incluye simultáneamente regiones conservadas y otras hipervariables, lo cual lo hace ideal para este tipo de trabajos (Vences, *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

- Evaluar morfológica y genéticamente el estatus taxonómico de *Pristimantis verecundus* para determinar si representa una o varias especies.

MÉTODOS

Los especímenes y tejidos estudiados están depositados en las siguientes colecciones: Instituto Nacional de Biodiversidad, Quito, Ecuador (INABIO), Museo de Zoología de la Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito, Ecuador, (MZUTI), Museo de Zoología Terrestre de la Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá, Ecuador y el Instituto de Investigación de Recurso Biológicos Alexander von Humboldt. Los especímenes de esta última colección están listados bajo el acrónimo original de Inderena: IND-AN. Véase Anexo 1.

Morfología

Examinamos ocho variables morfométricas (véase Anexo 2) siguiendo las claves y descripciones de Lynch y Duellman (1997, 1990): (1) longitud del pie (FL), (2) longitud de la mano (HL), (3) largo de la cabeza (HL), (4) longitud del fémur (FL), (5) ancho de la cabeza (HW), (6) longitud del hocico-orificio (SVL), (7) longitud de la tibia (TL), (8) longitud del brazo (AL). El sexo y madurez sexual se determinaron por la presencia de hendiduras bucales, un saco vocal en machos o la presencia de oviductos no rectos en hembras. Las medidas morfológicas se tomaron con el calibrador digital Mitutoyo® al 0.1 mm más cercano, según lo descrito por Guayasamin (2004).

Para el análisis de datos morfométricos se realizó un análisis de componente principal (PCA) y un análisis multivariante de la varianza (MANOVA). El PCA es un método que reduce la dimensionalidad de una gran cantidad de datos transformándolos en un grupo mas pequeño, pero conservando la mayor cantidad de información posible haciendo el análisis de los datos más sencillo, rápido y fácil de visualizar (Ringnér, 2008). Mientras que el MANOVA prueba

si hay una diferencia significativa entre las medias de varios grupos y limita el número de errores tipo I (Huberty y Olejnik, 2006).

Extracción de ADN y PCR para el gen 16S rRNA

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo con Tiocinato de guanidina, diseñado por Chomkzynski (1993), mediante el cual se extrajo ADN genómico de tejido conservado en etanol. Se cuantificaron cada una de las muestras para obtener la concentración y calidad de ADN obtenido y se procedió a realizar el proceso de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la amplificación del gen 16S rRNA se utilizó el protocolo establecido por Guayasamin *et al.*, (2017) mientras que la secuenciación se realizó mediante el método Sanger (Sanger y Coulson, 1975).

En el proceso de amplificación de ADN se utilizaron los primers 16SC-F (5' - GTR GGC CTA AAA GCA GCC AC – 3') y el primer 16Sbr-H-R (5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T – 3') diseñados por Darst y Cannatella (2004) y Palumbi *et al.* (1991). Cada reacción de PCR contenía una concentración final de 1.5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTP, 0,25 U / μL de ADN polimerasa *Taq* (Invitrogen) y 0,2 μM de cada cebador, en un volumen total de 25 μL. Para el fragmento (16S rNA), el protocolo utilizado incluyó un paso inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94 °C; seguido de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 57°C, 2 minutos a 72 °C por 30 ciclos, y una extensión final de 8 minutos a 72 °C.

El amplicon obtenido se visualizó por medio de electroforesis con un gel de agarosa al 2%. Las muestras amplificadas se limpiaron con Exosap y se enviaron a Macrogen Inc (Corea del Sur) para la secuenciación de Sanger (Sanger, Coulson, 1975). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y ensambladas en Geneious 11.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). En la base de datos del NCBI©, mediante BLAST (Altschul, 1990), se realizaron comparaciones preliminares para

determinar que especies son, potencialmente, las más cercanas a *P. verecundus*. Así se escogieron los grupos externos, obteniendo las secuencias directamente de GenBank (véase Anexo 1). Todas las secuencias utilizadas en este estudio, así como sus localidades respectivas y códigos GenBank, se encuentran detalladas en el Anexo 1.

Análisis filogenéticos

Se generaron 24 secuencias de *Pristimantis verecundus* desde el sitio de estudio y otras regiones geográficas del Ecuador (Anexo 1). Además, se descargaron secuencias del GenBank como grupos externos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ver Anexo 1.

Las secuencias del gen mitocondrial 16S se alinearon de forma independiente utilizando el programa MAFFT v7 (Kato, Standley, 2013), con la estrategia Q-INS-i. El alineamiento obtenido fue revisado manualmente en Mesquite 3.51 (Madison, Madison, 2018).

Las secuencias alineadas se analizaron en IQ-TREE v1.6.8 para encontrar el modelo evolutivo apropiado (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). Basado en este modelo, se infirió una inferencia filogenética usando el método de máxima verosimilitud en el programa IQ-TREE v1.6.8 (Nguyen *et al.*, 2015). La confiabilidad y robustez del árbol se evaluó utilizando una aproximación de arranque ultra rápida de 10000 bootstraps (Hoang *et al.*, 2017). El comando -bnni se usó para reducir el riesgo de sobreestimar las longitudes de las ramas. Ejecutamos 10 millones de generaciones con las opciones predeterminadas. Las topologías se visualizaron en FigTree v1.4 (Rambaut, 2017).

RESULTADOS

Morfología

El PCA de las ocho variables morfométricas tomadas de los 21 especímenes de estudio resultó en un PC (85.49%) donde las medidas morfométricas que más explican la variación son la longitud rostro-cloacal y la longitud del fémur (Fig. 2). Dado que los datos son normales, se realizó un análisis multivariante de la varianza (MANOVA), para encontrar la variación de las variables morfológicas entre localidades. El resultado evidenció un valor $p < 0.05$ para la longitud del fémur; por lo tanto, esta medida varía significativamente solo en los especímenes de Carchi con respecto a las otras localidades.

Análisis filogenéticos

El árbol filogenético obtenido muestra que *Pristimantis verecundus*, como está definido en la actualidad, no es monofilético (Fig. 4, 5). Adicionalmente, existe una alta diferenciación entre clados, con distancias genéticas de 0.05-0.12% (distancias no corregidas en PAUP) mientras que los individuos de cada uno de los clados muestran una diferenciación de 0.01-0.04% (Tabla 2). El primer clado A incluye a *Pristimantis* de Carchi, el clado B a *Pristimantis* de Cotopaxi, los clados C, E, F y G incluyen *Pristimantis* de Imbabura, los clados D y H a *Pristimantis* de Imbabura y Pichincha. Se debe mencionar que no hay secuencias disponibles de la localidad tipo de la especie.

DISCUSIÓN

El análisis filogenético en base al gen 16S permitió identificar ocho clados dentro de lo que actualmente se reconoce como *Pristimantis verecundus*, lo cual demuestra que hay diversidad críptica en esta especie. Sin embargo, con los datos obtenidos, no podemos asignar con confianza a ninguna de las poblaciones de Ecuador a la serie tipo de *Pristimantis verecundus* debido a que la morfometría de esta no concuerda con las poblaciones estudiadas y por la ausencia de secuencias de la población tipo.

En cuanto a la diversidad dentro del complejo *verecundus*, según Fouquet *et al.* (2007), Vences *et al.* (2005), Vences y Wake (2007) las distancias genéticas en la región 16S por encima del umbral del 2.5% indican que las poblaciones pueden representar especies candidatas. Considerando los porcentajes anteriormente descritos, se observa que el Clado A y el Clado B poseen una distancia genética entre 5-12% con respecto a los otros clados y una distancia de 5% entre ellos (Tabla 2).

Algunas de las distancias genéticas encontradas pueden explicarse por la presencia de barreras geográficas en los Andes, variación ecológica, así como la distancia entre localidades. En el caso del Clado A, se recolectaron muestras en la provincia de Cotopaxi a una elevación de 1500 msnm y el Clado B en la provincia de Carchi a una elevación de 2304 msnm; aunque esta diferencia altitudinal no debería representar ninguna barrera geográfica, si podría conllevar una considerable variación ecológica (Hutter *et al.*, 2013; Arteaga *et al.*, 2016; Guayasamin *et al.*, 2017).

El Clado E, en comparación con los Clados F y G, muestra distancia del 8%, similar a los Clados F y G que poseen una distancia de 6% (Tabla 2). Estos tres son los clados más cercanos geográficamente a la localidad tipo de la especie (Reserva La Planada) descrita por

Lynch y Burrowes (1990). Sin embargo, debido a su distancia genética y a sus diferencias en cuanto a su morfometría, nos vemos ante un escenario en el cual pueden coexistir tres especies en la misma zona geográfica.

Considerando estos parámetros e inferencias, no se puede asegurar la presencia *Pristimantis verecundus* en el Ecuador. Todas las poblaciones geográficamente cercanas (Clados: E, F y G) presentan diferencias morfológicas conspicuas en relación a las descritas para la serie tipo de la especie (véase Lynch y Burrowes, 1990).

Finalmente, los resultados de este estudio sugieren que los distintos niveles de elevación, como barreras geográficas, facilitan la diversificación en los anuros. Esto es particularmente evidente en el género *Pristimantis*, el cual posee alrededor de 528 especies descritas (AmphibiaWeb, 2019) y una notable diversificación (Gascón, *et al.*, 2000; Elmer, *et al.*, 2007; García, *et al.*, 2012; Guayasamin, *et al.*, 2017). Dos factores, que, al parecer, causan esta alta tasa de especiación son la alta mutación (Crawford, 2003) y la baja capacidad de dispersión (Hillman, *et al.*, 2013). Esta última puede estar afectada por el tamaño, amplitud fisiológica y la forma reproductiva de las especies (Ghalambor, 2006; Pabijan, *et al.*, 2012; Hillman, *et al.*, 2013).

Concluimos que el reconocimiento taxonómico de los linajes encontrados dentro del complejo *verecundus* es todavía prematuro y debe esperar a la obtención de secuencias de la localidad tipo (Reserva La Planada) en Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410. PubMed
- AmphibiaWeb. 2019. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 29 Jun 2019.
- Arteaga, A., Pyron, R. A., Penafiel, N., Romero-Barreto, P., Culebras, J., Bustamante, L., ... & Guayasamin, J. M. (2016). Comparative phylogeography reveals cryptic diversity and repeated patterns of cladogenesis for amphibians and reptiles in northwestern Ecuador. *PloS one*, 11(4), e0151746.
- Centro Jambatu. 2011–2017. Anfibios de Ecuador. Base de datos electrónica disponible en <http://www.anfibioswebecuador.ec/index.php?aw,2>. Fundación Otonga. Quito, Ecuador.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), 532-4.
- Crawford, A. J. (2003). Relative rates of nucleotide substitution in frogs. *Journal of Molecular Evolution*, 57(6), 636-641.
- Darst CR, Cannatella DC. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial
- Elmer, K. R., Dávila, J. A., & Lougheed, S. C. (2007). Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 247.

- Fouquet A, Vences M, Salducci M-D, Meyer A, Marty C, Blanc M, Gilles A (2007) Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 567–582.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., & Gemmell, N. J. (2007). Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one*, 2(10), e1109.
- Frenkel, C., Guayasamín, J. M., Yáñez-Muñoz, M. H., Varela-Jaramillo, A., & Ron, S. R. (2014). *Pristimantis curtipes*. Ron, SR, Guayasamin, JM, Yanez-Muñoz, MH, Merino-Viteri, A., Ortiz, DA y Nicolalde, DA.
- Frost, D. R. (2019). *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0 New York, USA: American Museum of Natural History. Retrieved from <http://researchamnh.org/herpetology/amphibia/indexhtml> (date of (accessed 15 April 2018). [Google Scholar]
- García-R, J. C., Crawford, A. J., Mendoza, Á. M., Ospina, O., Cardenas, H., & Castro, F. (2012). Comparative phylogeography of direct-developing frogs (Anura: Craugastoridae: *Pristimantis*) in the southern Andes of Colombia. *PLoS One*, 7(9), e46077.
- Gascon, C., Malcolm, J. R., Patton, J. L., da Silva, M. N., Bogart, J. P., Loughheed, S. C., ... & Boag, P. T. (2000). Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13672-13677.

- Ghalambor, C. K., Huey, R. B., Martin, P. R., Tewksbury, J. J., & Wang, G. (2006). Are mountain passes higher in the tropics? Janzen's hypothesis revisited. *Integrative and comparative biology*, 46(1), 5-17.
- Gonzalez-Voyer, A., Padial, J. M., Castroviejo-Fisher, S., De La Riva, I., & Vilà, C. (2011). Correlates of species richness in the largest Neotropical amphibian radiation. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(5), 931-942.
- Guayasamín, J. M., Hutter, C. R., Tapia, E. E., Culebras, J., Peñafiel, N., Pyron, R. A., ... & Arteaga, A. (2017). Diversification of the rainfrog *Pristimantis ornatissimus* in the lowlands and Andean foothills of Ecuador. *PloS one*, 12(3), e0172615.
- Guayasamín, J. M., Krynak, T., Krynak, K., Culebras, J., & Hutter, C. R. (2015). Phenotypic plasticity raises questions for taxonomically important traits: a remarkable new Andean rainfrog (*Pristimantis*) with the ability to change skin texture. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173(4), 913-928.
- Hedges, S. B., Duellman, W. E., & Heinicke, M. P. (2008). New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737(1), 1-182.
- Heinicke, M. P., Duellman, W. E., & Hedges, S. B. (2007). Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10092-10097.
- Hillman, S. S., Drewes, R. C., Hedrick, M. S., & Hancock, T. V. (2013). Physiological vagility: correlations with dispersal and population genetic structure of amphibians. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(1), 105-112.

- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2017). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular biology and evolution*, *35*(2), 518-522.
- Huberty, C. J., & Olejnik, S. (2006). *Applied MANOVA and discriminant analysis* (Vol. 498). John Wiley & Sons.
- Hutter, C. R., Guayasamin, J. M., & Wiens, J. J. (2013). Explaining Andean megadiversity: the evolutionary and ecological causes of glassfrog elevational richness patterns. *Ecology letters*, *16*(9), 1135-1144.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group 2018. *Pristimantis verecundus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T57036A85881606. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T57036A85881606.en>. Downloaded on 15 March 2019.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, *14*(6), 587.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, *30*(4), 772-780.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647-1649.

- Lehr, E., & Duellman, W. E. (2009). *Terrestrial-breeding frogs (Strabomantidae) in Peru*. Natur und Tier Verlag.
- Lynch, J. D., & Burrowes, P. A. (1990). *The frogs of the genus (Family Leptodactylidae) at the la Planada reserve in Southwestern Colombia with descriptions of eight new species*(No. 59 UNI).
- Lynch, J. D., & Duellman, W. E. (1997). Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in Western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography. Special Publication 23. *Natural History Museum, University of Kansas, Lawrence*.
- Maddison, W. P., D.R. Maddison. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51 <http://www.mesquiteproject.org>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268.
- Pabijan, M., Wollenberg, K. C., & Vences, M. (2012). Small body size increases the regional differentiation of populations of tropical mantellid frogs (Anura: Mantellidae). *Journal of evolutionary biology*, 25(11), 2310-2324.
- Padial, J. M., Grant, T., & Frost, D. R. (2014). Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*, 3825(1), 1-132.
- Palumbi SR, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. The Simple Fool's Guide to PCR. Version 2.0. Honolulu: University of Hawaii; 1991.

- Rambaut, A. (2017). FigTree-version 1.4. 3, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Ringnér, M. (2008). What is principal component analysis?. *Nature biotechnology*, 26(3), 303.
- Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A., & Nicolalde, D. A. (2016). AmphibiaWebEcuador. Versión 2016.0. Quito, Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Vences, M., & Wake, D. B. (2007). Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. *Amphibian biology*, 7, 2613-2671.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in zoology*, 2(1), 5.

TABLAS

Tabla 1. Morfometría (en mm) del holotipo (IavH 1834), parapototipos y especímenes adicionales del complejo de especies reconocido como *Pristimantis verecundus*.

Número de Museo	Género	SVL	Longitud del Pie	Longitud de la Mano	Longitud de la cabeza	Ancho de la cabeza	Longitud de la Tibia	Longitud del Brazo	Longitud del Femur
IND-AN 1834	Hembra	22.46	10.37	6.16	8.79	8.77	10.81	5.75	11.65
IND-AN 6664	Macho	16.47	7.19	5.38	6.28	6.98	10.28	4.46	9.78
IND-AN 1492	Macho	17.43	8.28	4.49	6.05	6.19	8.45	5.03	9.06
IND-AN 1457	Hembra	22.22	9.72	5.89	7.82	7.44	10.84	5.47	10.6
IND-AN 1801	Hembra	20.29	8.41	5.21	8.48	7.21	10.38	5.22	10.53
JMG 0675	Macho	16.54	7.05	4.19	5.08	4.81	7.3	3.4	7.83
JMG 0690	Hembra	21.83	9.4	6.2	8.02	8	10.29	5.07	9.75
JMG 0637	Macho	17.86	7.8	5.12	6.95	6.5	9.09	5.53	8.18
JMG 1014	Macho	18.1	7.75	5.13	6.16	6.55	8.92	4.23	8.65
JMG 0062	Hembra	16.67	8.2	5.16	6.18	6.19	8.53	4.47	9.06

MZUTI 0540	Macho	14.67	7.52	4.53	5.15	5.89	8.37	5	8.4
MZUTI 0541	Hembra	22.6	7.75	5.5	9.3	8.8	10.4	5.3	10.5
MZUTI 0635	Macho	13.94	10.4	4.48	5.26	7.02	7.72	3.9	7.86
MZUTI 0539	Macho	16.08	6.3	4.21	4.8	4.9	7.73	3.29	7.41
MZUTI 3922	Hembra	16.54	6.7	4.48	6.7	6.57	7.96	4.39	8.15
MZUTI 3903	Macho	17.87	7.12	4.44	7.34	6.71	8.3	3.87	7.86
MZUTI 3764	Macho	16.54	6.82	4.19	5.08	4.81	7.3	3.4	7.83
MZUTI 0576	Macho	19.5	7.03	5.03	7.5	7.5	8.12	4.6	8.5
MZUTI 2114	Macho	14.72	6.45	3.95	5.98	5.62	7.3	3.94	6.73
DHMECH 13989	Macho	16.07	7.20	4.19	5.11	5.31	7.09	3.25	6.06
DHMECH 14006	Hembra	21.52	8.71	5.97	7.22	7.04	9.87	5.79	8.26

Las siglas para museos son: IavH = Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Colombia; JMG = Juan Manuel Guayasamin, Ecuador; DHMECH = Instituto Nacional de Biodiversidad, Ecuador; MZUTI = Museo de Zoología de la Universidad Tecnológica Indoamérica, Ecuador.

Tabla 2. Distancias genéticas no corregidas en PAUP entre los diferentes clados.

Clado	A	B	C	D	E	F	G	H
A	-							
B	0.05	-						
C	0.09	0.09	-					
D	0.11	0.10	0.09	-				
E	0.11	0.08	0.09	0.08	-			
F	0.12	0.12	0.11	0.08	0.08	-		
G	0.12	0.10	0.11	0.09	0.08	0.06	-	
H	0.11	0.09	0.10	0.07	0.07	0.04	0.3	-

FIGURAS

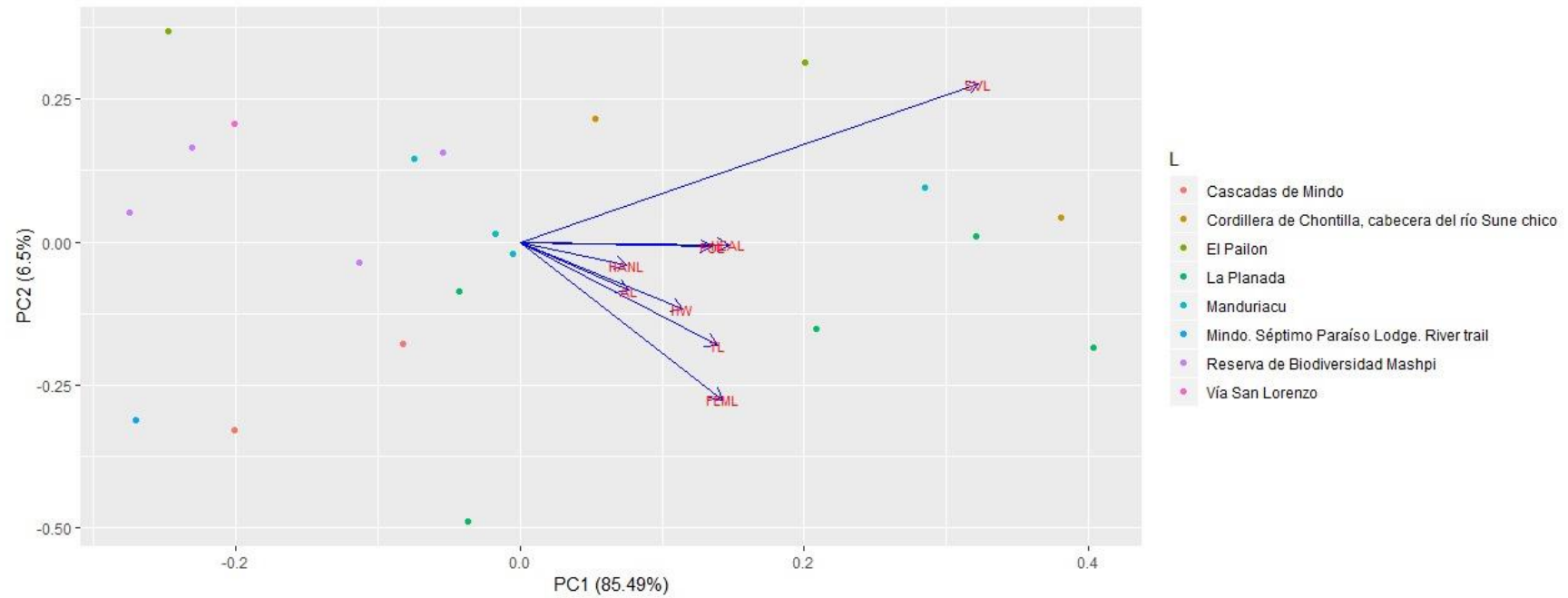


Figura 1. Análisis de componente principal (PCA) de morfometría con las ocho variables medidas de los especímenes de estudio, incluyendo el holotipo y paratopotipo (La Planada).

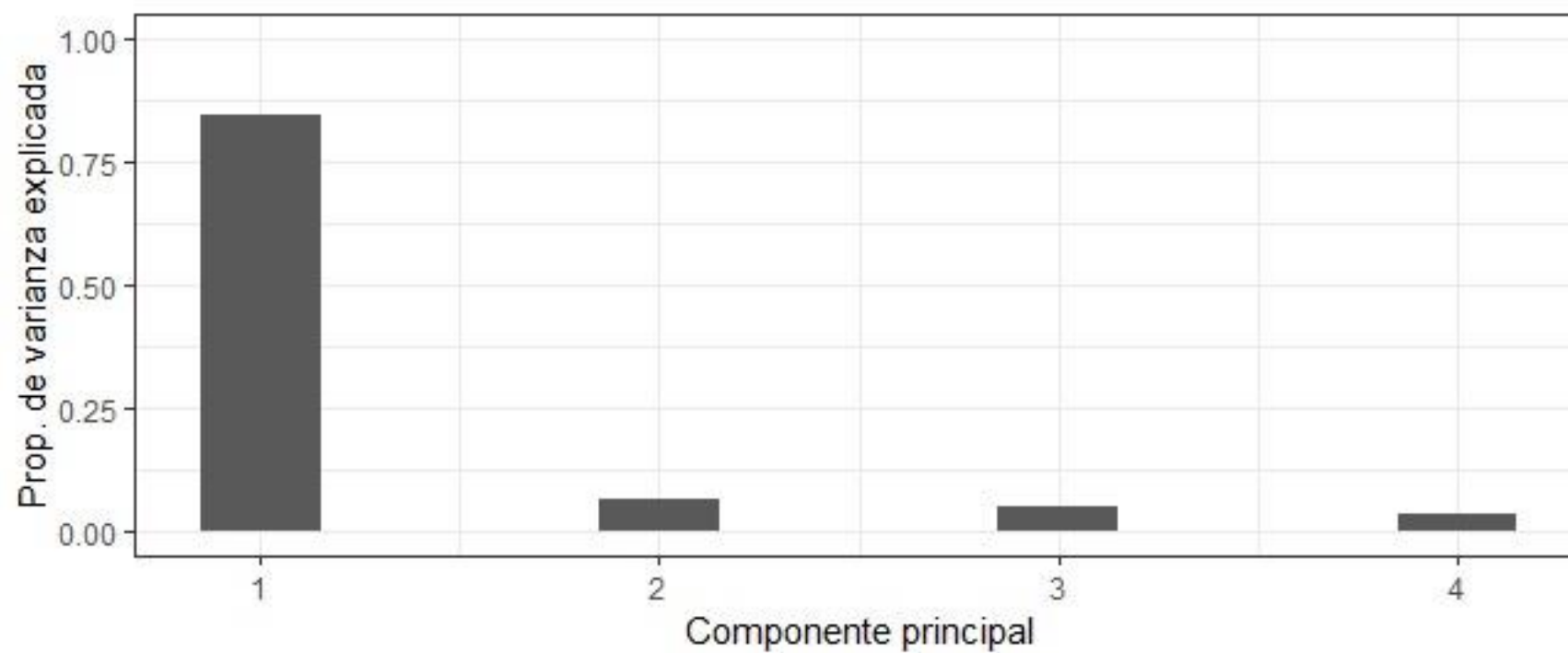
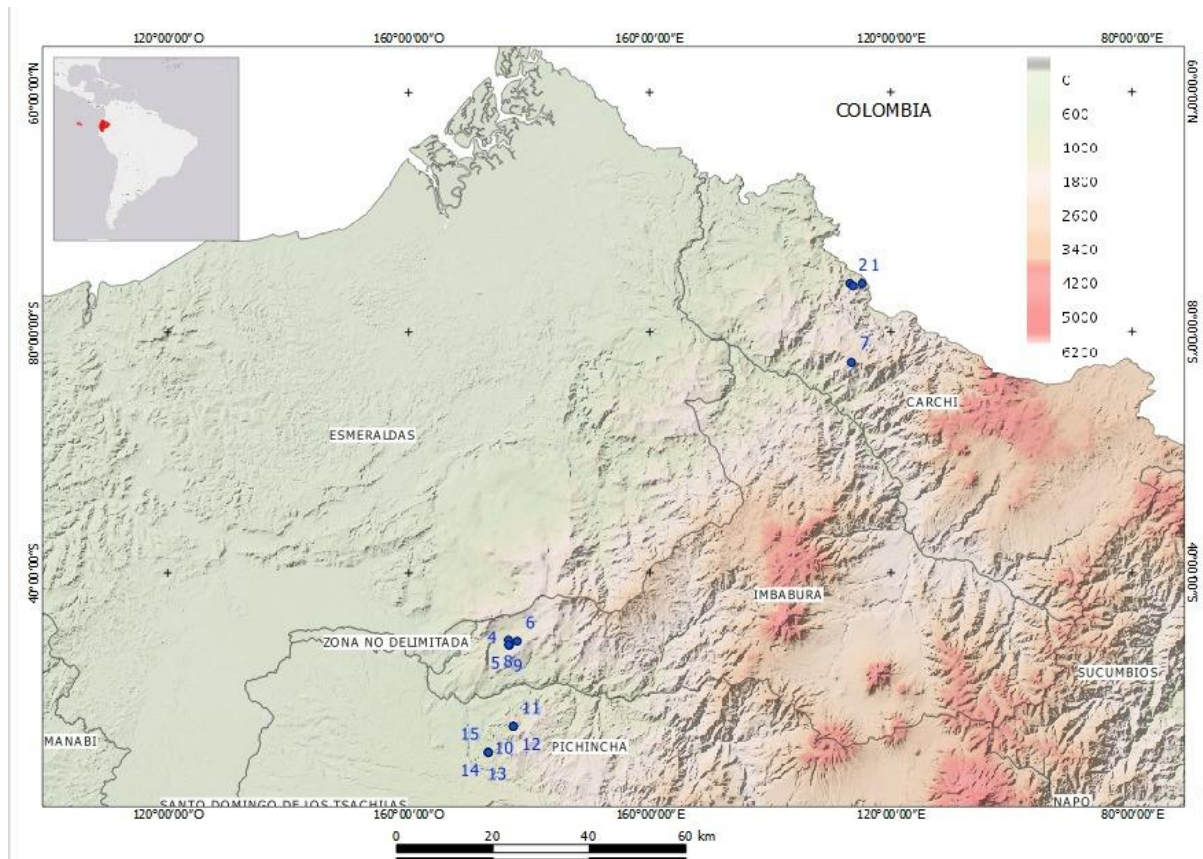


Figura 2. Proporción de varianza acumulada en los componentes principales del PCA.



Nº	Especie	Nº de museo	Provincia	Localidad
1	<i>Pristimantis verecundus</i>	DHMECH 12599	Carchi	Tulcán. Tobar Donoso, Gualpi, Chical
2	<i>Pristimantis verecundus</i>	DHMECH 13989	Carchi	Tulcán. Chical El Pail?n
3	<i>Pristimantis verecundus</i>	DHMECH 14006	Carchi	Tulcán. Chical. El Pail?n
4	<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0636	Imbabura. Cotacachi	Manduriacu
5	<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0637	Imbabura. Cotacachi	Manduriacu
6	<i>Pristimantis mutabilis</i>	JMG 0641	Imbabura. Cotacachi	Manduriacu
7	<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0675	Carchi	V?a San Lorenzo
8	<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0690	Imbabura. Cotacachi	Manduriacu
9	<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 1014	Imbabura. Cotacachi	Manduriacu
10	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 3764	Pichincha	Reserva de Biodiversidad Mashpi
11	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 3903	Pichincha	Reserva de Biodiversidad Mashpi
12	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 3922	Pichincha	Reserva de Biodiversidad Mashpi
13	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 634	Pichincha	Cordillera de Chontilla, cabecera del río Sune Chico
14	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 635	Pichincha	Cordillera de Chontilla, cabecera del río Sune Chico
15	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 636	Pichincha	Cordillera de Chontilla, cabecera del río Sune Chico
16	<i>Pristimantis verecundus</i>	QCAZ12410	Ecuador	Cotopaxi, Reserva Otonga
17	<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 2114	Ecuador	Pichincha, S?ptimo Para?so Lodge

Figura 3. Distribución geográfica de los especímenes del área de estudio.

A



B



C



D



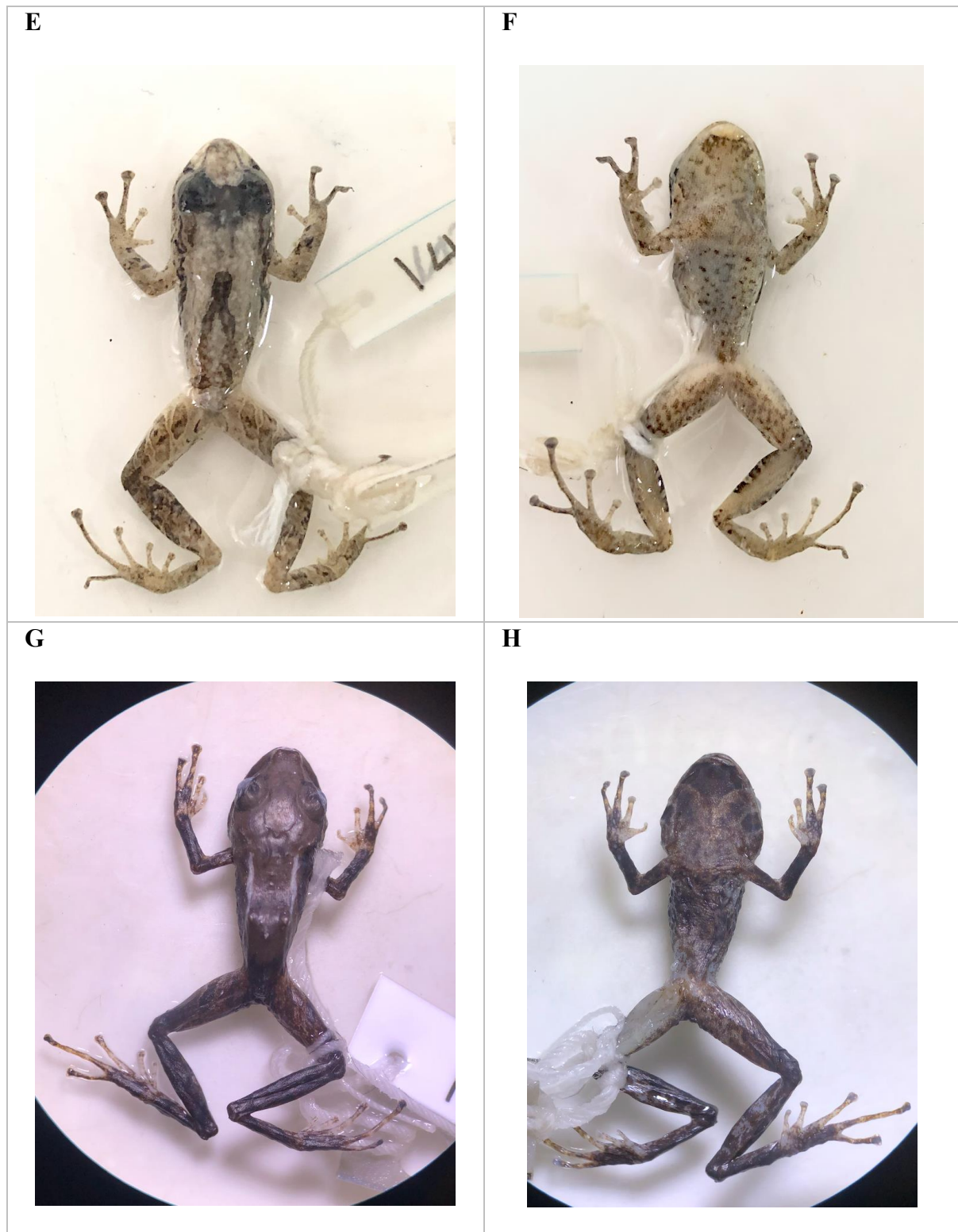


Figura 4. (A, B) *Pristimantis verecundus*, holotipo, IND-AN 1834, en alcohol. Reserva Natural la Planada, Colombia, 1780msnm. (C, D) JMG0675, Vía San Lorenzo, 23166msn, Provincia de Carchi, Ecuador. (E, F) DHMECH 14006, El Pailón, 1495 msnm, Provincia de Carchi, Ecuador. (G, H) MZUTI 2114, Séptimo Paraíso, 1599 msnm, Provincia de Pichincha, Ecuador.

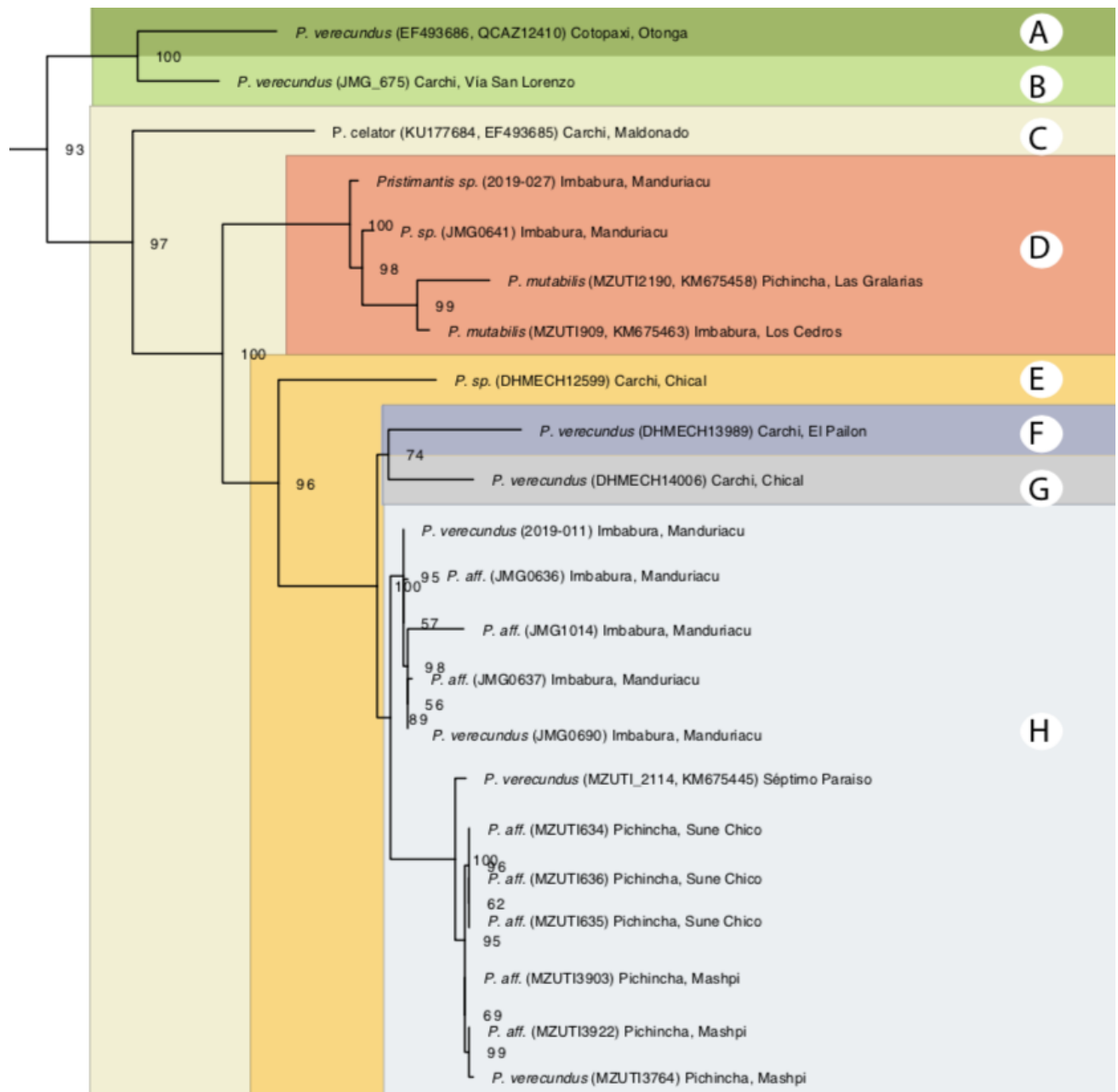


Figura 6. Relaciones evolutivas entre las poblaciones que actualmente forman parte del complejo *Pristimantis verecundus*.

ANEXOS

Anexo 1.

Todas las muestras pertenecen al género *Pristimantis*, excepto *Craugastor longirostris*, que forma parte del grupo externo. Para cada individuo, se detallan el número de museo, la localidad y el número de acceso de GenBank. Las siglas para museos son: JMG = Juan Manuel Guayasamín, Ecuador; MZUTI = Museo de Zoología de la Universidad Tecnológica Indoamérica, Ecuador; KU = University of Kansas Natural History Collection, QCAZ = Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador; UVC = Universidad del Valle, Colombia.

Especie	Número de museo	Localidad (Provincia: localidad)	Latitud	Longitud	Elevación (m)	Número de acceso de GenBank 16S rNA
<i>Pristimantis verecundus</i>	DHMECH 12599	Carchi: Tulcán. Tobar Donoso, Gualpi, Chical	0.898426	-78.207942	1600	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	DHMECH 13989	Carchi: Tulcán. Chical El Pailón	0.989154027	-78.23087876	1385	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	DHMECH 14006	Carchi: Tulcán. Chical. El Pailón	0.984504212	-78.22493952	1495	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0636	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	737798	34634	1476	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0637	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	737730	34680	1515	-
<i>Pristimantis mutabilis</i>	JMG 0641	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	739423	35469	1264	-

<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0675	Carchi: Vía San Lorenzo	0.84365	-78.22812	2304	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 0690	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	737595	35712	1588	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	JMG 1014	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	737658	34688	1563	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 3764	Pichincha: Reserva de Biodiversidad Mashpi	0.16075	-78.85611	1279	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 3903	Pichincha: Reserva de Biodiversidad Mashpi	0.16075	-78.85611	1279	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 3922	Pichincha: Reserva de Biodiversidad Mashpi	0.16075	-78.85611	1279	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 634	Pichincha: Cordillera de Chontilla, cabecera del río Sune Chico	0.11187	-78.90275	1241	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 635	Pichincha: Cordillera de Chontilla, cabecera del río Sune Chico	0.11187	-78.90275	1241	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 636	Pichincha: Cordillera de Chontilla, cabecera del río Sune Chico	0.11187	-78.90275	1241	KM675441
<i>Pristimantis cf. pteridophilus</i>	219-009	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis verecundus</i>	219-011	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis cedros</i>	219-012	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis sp.</i>	219-019	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis sp.</i>	219-020	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-

<i>Pristimantis sobetes</i>	219-023	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis cedros</i>	219-026	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis mutabilis</i>	219-027	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Pristimantis sp.</i>	219-028	Imbabura. Cotacachi: Manduriacu	-	-	-	-
<i>Eleutherodactylus sp.</i>	WED 52979; KU 202623	Ecuador: Napo; 8 km E Santa Bárbara	-	-	-	AY326002
<i>Pristimantis duellmani</i>	WED 53050; KU 202404	Ecuador: Carchi; 13.6 km W El Carmelo	-	-	2340	AY326003
<i>Pristimantis supernatis</i>	WED 52961; KU 202432	Ecuador: Napo; 3.5 km E Santa Barbara	-	-	-	AY326005
<i>Pristimantis chloronotus</i>	WED 52959; KU 202325	Ecuador: Napo; 3.5 km E Santa Bárbara	-	-	-	AY326007
<i>Pristimantis thymelensis</i>	WED 53004; KU 202519	Ecuador: Carchi; 12 km W Tufino	-	-	3520	AY326009
<i>Pristimantis buckleyi</i>	KU217836	Ecuador: Carchi, 9.0 km E El Ángel	0.630000	-77.940000	3133	EF493350
<i>Craugastor longirostris</i>	KU177803	Ecuador: Pichincha, Santo Domingo	-	-	-	EF493395
<i>Pristimantis gentryi</i>	KU218109	Ecuador: Cotopaxi, 27.6 km Pilaló	-0.950000	-78.990000	3121	EF493511
<i>Pristimantis truebae</i>	KU218013	Ecuador: Cotopaxi, 24.6 km Pilaló	-0.720000	-77.750000	1200	EF493512
<i>Pristimantis curtipes</i>	KU217871	Ecuador: Pichincha, Bosque de Pasochoa	-0.430000	-78.480000	3380	EF493513
<i>Pristimantis thymalopsoides</i>	KU177861	Ecuador: Cotopaxi, Pilalo	-0.910000	-78.970000	3010	EF493514

<i>Pristimantis trepidotus</i>	KU218234	Ecuador: Imbabura, 13.8 km W Tabacundo	0.050000	-78.230000	3002	EF493515
<i>Pristimantis thymelensis</i>	QCAZ16428	Ecuador: Napo, Paramo de Guamani	-0.720000	-77.610000	1128	EF493516
<i>Pristimantis ocreatus</i>	KU208508	Ecuador: Carchi, 26.6 km W Tulcán	-	-	-	EF493682
<i>Pristimantis pyrrhomerus</i>	KU218030	Ecuador: Bolívar, Bosque Protector Cashca Totoras	-1.570000	-79.110000	1996	EF493683
<i>Pristimantis leoni</i>	KU218227	Ecuador: Carchi, 51.3 km W Tulcán	0.820000	-77.730000	2941	EF493684
<i>Pristimantis celator</i>	KU177684	Ecuador: Carchi, Maldonado	0.900000	-78.920000	55	EF493685
<i>Pristimantis verecundus</i>	QCAZ12410	Ecuador: Cotopaxi, Reserva Otonga	-0.418899	-79.003899	1500	EF493686
<i>Pristimantis surdus voucher</i>	KU177847	Ecuador: Imbabura, La Delicia	0.210000	-78.330000	2766	EF493687
<i>Pristimantis devillei</i>	KU217991	Ecuador: Napo, 6.1 km E Papallacta	-0.370000	-78.140000	3727	EF493688
<i>Pristimantis vertebralis</i>	KU177972	Ecuador: Imbabura, La Delicia	0.370000	-78.380000	3355	EF493689
<i>Pristimantis quinquagesimus</i>	KU179374	Ecuador: Pichincha, Quebrada Zapadores	-0.430000	-78.480000	3380	EF493690
<i>Pristimantis sp.</i>	KU218140	Ecuador: Chimborazo, 35 km SW diviso Panamerico vía Pallatanga	-	-	2860	EU186661
<i>Pristimantis eriphus</i>	QCAZ32705	Ecuador: Napo, Yanayacu	-1.100000	-78.480000	3168	EU186671
<i>Pristimantis sp.</i>	KU179221	Ecuador: Cotopaxi, Pilalo	-	-	-	EU186700
<i>Pristimantis jubatus</i>	UVC:15877	Colombia	2.638278	-76.915194	2542	JN104663
<i>Pristimantis hectus</i>	UVC:15942	Colombia	-	-	-	JN104680
<i>Pristimantis verecundus</i>	MZUTI 2114	Ecuador: Pichincha, Séptimo Paraíso Lodge	-0.028500	-78.766000	1521	KM675445

<i>Pristimantis mutabilis</i>	MZUTI 2190	Ecuador: Pichincha, Reserva Las Gralarias, near research station	-	-	-	KM675458
<i>Pristimantis mutabilis</i>	MZUTI 909	Ecuador: Imbabura, Reserva Los Cedros, Oso transect	-	-	-	KM675463
<i>Pristimantis gralarias</i>	MZUTI 1466	Ecuador	-0.027500	-78.704800	2192	MH306193
<i>Craugastor longirostris</i>	KU177803	Ecuador: Pichincha, Santo Domingo	-	-		EF493395

Anexo 2.

Medidas utilizadas para la morfometría de *Pristimantis verecundus*.

