

RECONOCIMIENTO INTERESPECÍFICO DEL CANTO ENTRE *Epipedobates boulengeri* y
E. narinensis (ANURA: DENDROBATIDAE) DEL PACÍFICO DE NARIÑO, COLOMBIA.

JAVIER FERNANDO SANTANDER OLIVA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PASTO
2019

RECONOCIMIENTO INTERESPECÍFICO DEL CANTO ENTRE *Epipedobates boulengeri* y
E. narinensis (ANURA: DENDROBATIDAE) DEL PACÍFICO DE NARIÑO, COLOMBIA.

Presentado por:
JAVIER FERNANDO SANTANDER OLIVA

Asesorado por:
Ms. Marvin Anganoy Criollo
Magister en Ciencias – Biología
MSc. Belisario Cepeda Quilindo
Magister en Ciencias Biológicas

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo
Modalidad: Trabajo de investigación

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PASTO
2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Director

Belisario Cepeda-Quilindo, MSc

Director

Marvin Anganoy-Criollo, MSc

Jurado

Pablo Palacios Rodríguez, PhD

Jurado

David Antonio Sánchez, PhD

San Juan de Pasto, 5 de septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mis abuelos Segundo y Aura, a mis padres Javier y Miryam, a mis tíos y hermanos, por siempre estar a mi lado en este camino.

A la Vicerrectoría de investigaciones VIPRI, por la financiación del proyecto.

Al grupo de investigación Biología de y Páramos y Ecosistemas Andinos, por siempre apoyarme en la consecución de recursos y equipos.

A Belisario Cepeda y Marvin Anganoy, por fomentar y guiarme en la rama mas hermosa de la biología (La Herpetología).

A los jurados Pablo Palacios y David Sánchez, por todos sus aportes y revisión del proyecto.

A mis auxiliares de campo Pablo Portilla y Edwin Beltrán, quienes me acompañaron y ayudaron en la toma de datos en los sitios de muestreo.

A Luis Recalde y Luis Ignacio Gómez, por la ayuda y asesoría en el análisis de datos y a mis compañeros y amigos de Biología en general, por recorrer junto a mi el camino del aprendizaje.

DEDICATORIA

Especialmente a Angela Álvarez,

a quien le dedico este esfuerzo investigativo con todo mi amor, muchas gracias por ser esa fuerza

química y biológica primordial para la existencia temporal que compartimos,

gracias porque junto a ti tratamos de entender el fenómeno de la vida desde distintos aspectos

e infinitas gracias por todo tu apoyo amor.

RESUMEN

La bioacústica parte de la capacidad de reconocer entre individuos heterospecíficos y conespecíficos, esencial en elección de pareja, aislamiento reproductivo y procesos de especiación. En el pacífico nariñense, existen dos ranas del género *Epipedobates*, que son un buen modelo para probar dichos procesos.

Se tuvo en cuenta la morfometría de individuos que están depositados en la colección PSO-CZ, debido, a que el tamaño se relaciona con las frecuencias; posteriormente se realizaron grabaciones y se describieron *Llamados de advertencia* de *E. boulengeri* y *E. narinensis*, en Granja Mar Agrícola, Tumaco y Reserva Natural Biotopo, Barbacoas. Se midieron variables espectro-temporales, se presenta una descripción del llamados de advertencia, en donde se determinaron el tipo y la forma, siendo esta, la primera investigación que describe los llamados de advertencia de *E. narinensis*. Se probaron estímulos acústicos (*playback*) intra e interespecíficos, para evidenciar respuestas visuales y/o acústicas, se midieron las respuestas acústicas, las señales visuales se grabaron en video y se caracterizaron con análisis audiovisual. Los resultados demuestran que entre las especies evaluadas no hay diferencias significativas en ninguna variable morfométrica, pero si en las variables bioacústicas, más evidentes en las variables temporales que en variables espectrales, la frecuencia fundamental oscila entre 5.000 y 6.200 Hz. Pruebas de *playback* revelaron que los individuos de *E. boulengeri* de Tumaco, responden a los llamados inter e intraespecíficos mediante señales visuales, en Biotopo, las respuestas al *playback* no fueron evidentes debido a la densidad poblacional, pero se logró confirmar la simpatria de las especies lo que concuerda con la divergencia fenotípica y acústica, la cual es mayor en situaciones simpátricas; como resultado del análisis audiovisual se presenta un conjunto fotogramas que describen varios comportamientos.

ABSTRACT

Bioacoustics studies the ability to recognize between heterospecific and conspecific individuals, essential in partner choice, reproductive isolation and speciation processes. In the Pacific Nariñense, there are two frogs of the genus *Epipedobates*, which are a good model to test these processes.

The morphometry of individuals that are deposited in the PSO-CZ collection was considered, because size is related to frequencies; subsequently, recordings were made and warning calls of *E. boulengeri* and *E. narinensis* were described, in Granja Mar Agrícola, Tumaco and Reserva Natural Biotopo, Barbacoas. Spectrum-temporal variables were measured, a description of the warning calls is presented, where the type and form were determined, this being the first investigation describing the warning calls of *E. narinensis*. Intra and interspecific acoustic stimuli (*playback*) were tested to show visual and/or acoustic responses, acoustic responses were measured, visual signals were videotaped and characterized with audiovisual analysis. The results show that among the species evaluated there are no significant differences in any morphometric variable, but if in the bioacoustic variables, more evident in the temporal variables than in spectral variables, the fundamental frequency ranges between 5,000 and 6,200 Hz. *Playback* tests revealed that the individuals of *E. boulengeri* de Tumaco, respond to inter and intraspecific calls through visual signals; in Biotopo, the responses to playback were not evident due to population density, but it was possible to confirm the sympatry of the species which agrees with the phenotypic and acoustic divergence, which is greater in sympatric situations; as a result of the audiovisual analysis, a set of frames describing various behaviors is presented.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	17
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	27
6. MARCO TEÓRICO	28
6.1 Familia Dendrobatidae	28
6.1.1 Distribución	29
6.1.2 Hábitat, historia de vida y comportamiento	29
6.2 Género <i>Epipedobates</i>	29
6.2.1 Taxonomía actual del género <i>Epipedobates</i>	29
6.2.2 Hábitat, comportamiento y características morfológicas	31
6.2.3 Distribución	31
7. ESPECIES	32
7.1 <i>Epipedobates boulengeri</i>	32
7.1.1 Características morfológicas	32
7.1.2 Hábitat, comportamiento y dieta	33
7.1.3 Distribución	34
7.1.4 Taxonomía y relaciones evolutivas	34
7.2 <i>Epipedobates narinensis</i>	34
7.2.1 Características morfológicas	34
7.2.2 Hábitat y comportamiento	35
7.2.3 Distribución	35
7.3 Diferencias entre <i>E. boulengeri</i> y <i>E. narinensis</i>	35
8. COMUNICACIÓN ACÚSTICA	37
8.1 Tipos de llamados	39
9. COMUNICACIÓN VISUAL	40
9.1 Experimentos con estímulos acústicos (<i>playback</i>)	41

10 MATERIALES Y MÉTODOS	42
10.1 Ubicación del área de estudio	42
10.2 Descripción del área de estudio	44
10.2.1 Granja Mar Agrícola	44
10.2.2 Reserva Natural Biotopo	46
11. VARIABLES MORFOMÉTRICAS	49
12. GRABACIÓN DE CANTOS	50
12.1 Edición de las grabaciones	52
13. DESCRIPCIÓN DE LOS CANTOS	52
13.1 Variables acústicas	52
14. ANÁLISIS DE DATOS	55
15. EXPERIMENTOS DE PLAYBACK	56
15.1 Procedencia de los audios	56
15.2 Aplicación de las pruebas de <i>playback</i>	59
15.3 Respuestas visuales a partir del <i>playback</i>	62
15.4 Evaluación de las respuestas visuales obtenidas	63
16. RESULTADOS	65
16.1 Medidas morfométricas	65
16.2 Grabación y descripción de los cantos	67
16.3 Descripción de los cantos de <i>E. boulengeri</i> y <i>E. narinensis</i>	69
17. EXPERIMENTOS DE PLAYBACK	75
17.1 <i>Playback</i> en la Granja Mar Agrícola	75
17.2 <i>Playback</i> en la Reserva Natural Biotopo	80
17.3 Descripción de las respuestas visuales	82
18. RESULTADOS ADICIONALES	97
19. DISCUSIÓN	99
19.1 Variables morfométricas	100
19.2 Variación en los llamados de advertencia	101
19.3 Experimentos de <i>playback</i>	104
19.4 Reconocimiento interespecífico	105
19.5 <i>Playback</i> en la Reserva Natural Biotopo	107

19.6 Ruido biótico	110
20. AISLAMIENTO INTERESPECÍFICO Y EVOLUCIÓN DIVERGENTE	111
21. CONCLUSIONES	114
22. RECOMENDACIONES	115
LITERATURA CITADA	116
ANEXOS	125

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Especies de <i>Epipedobates</i> , desde el norte de Perú hasta el sur de Colombia. (Fuente: (Tarvin et al., 2017).....	19
<i>Figura 2.</i> Distribución geográfica de la familia Dendrobatidae. Fuente: Mapa de (Vitt &Caldwell, 2014).....	29
<i>Figura 3.</i> Descripción de <i>Epipedobates boulengeri</i> . Fuente: Ficha de (CITES, 2007).....	33
<i>Figura 4.</i> <i>Epipedobates narinensis</i> Reserva Natural Biotopo. Fuente: Foto de Mileidy Bethancourt, 2016, Foto de Fernando Santander, 2019.....	35
<i>Figura 5.</i> Variación ontogenética de los renacuajos de <i>Epipedobates narinensis</i> y de <i>E. boulengeri</i> Fuente: (Anganoy-Criollo & Cepeda-Quilindo, 2017).....	37
<i>Figura 6.</i> Producción de sonido y estructura de llamadas del sapo <i>Rhinella marina</i> . (Vitt & Caldwell, 2014).....	38
<i>Figura 7.</i> Fotografía satelital del suroccidente de Colombia, departamento de Nariño, con localidades de investigación. Fuente: (DigitalGlobe Microsoft Corporation, 2019).....	43
<i>Figura 8.</i> Fotografías aéreas de las localidades de investigación. Fuente: (DigitalGlobe Microsoft Corporation, 2019).....	43
<i>Figura 9.</i> Aspectos del bosque tropical en (Mar Agrícola). Fuente: Este estudio.....	45
<i>Figura 10.</i> Plantaciones en Mar Agrícola. Fuente: Este estudio.....	46
<i>Figura 11.</i> Hábitats de Biotopo. Fuente: Este estudio.....	48
<i>Figura 12.</i> Medidas morfométricas en <i>Andinobates</i> (Dendrobatidae) Fuente: Ilustración Ted R. Kahn.....	50
<i>Figura 13.</i> Esquema de la grabación de cantos Fuente: Este estudio	51
<i>Figura 14.</i> Espectrograma mostrando el llamado, nota y pulsos del canto de advertencia típico de <i>Epipedobates narinensis</i> . Fuente: Este estudio	54
<i>Figura 15.</i> Espectrogramas de las 4 pistas empleadas para <i>playback</i> . Fuente: Este estudio.....	58

<i>Figura 16.</i> Esquema del montaje para <i>playback</i> . Fuente: Este estudio	60
<i>Figura 17.</i> Fotografías del montaje para <i>playback</i> . Fuente: Este estudio	62
<i>Figura 18.</i> Señales visuales, levantamiento de extremidades. Fuente: (Hodl & Amézquita, 2001).....	64
<i>Figura 19.</i> Diagramas Boxplot (variables morfométricas). Fuente: Este estudio.....	66
<i>Figura 20.</i> Análisis de componentes principales (variables morfométricas). Fuente: Este estudio.....	67
<i>Figura 21.</i> Espectrogramas y oscilogramas <i>E. boulengeri</i> . Granja Maragricola. Fuente: Este estudio.....	71
<i>Figura 22.</i> Espectrogramas y oscilogramas <i>E. narinensis</i> . Reserva Natural Biotopo. Fuente: Este estudio.....	72
<i>Figura 23.</i> Diagramas Boxplot (variables acústicas). Fuente: Este estudio.....	73
<i>Figura 24.</i> Análisis de componentes principales (variables bioacústicas). Fuente: Este estudio...	74
<i>Figura 25.</i> Análisis discriminante de variables acústicas temporales. Fuente: Este estudio.....	75
<i>Figura 26.</i> Histograma a partir de datos de contingencia en las pruebas de <i>playback</i> . Fuente: Este estudio.....	77
<i>Figura 27.</i> Escalamiento Multidimensional no Métrico (EMD-NM). Fuente: Este estudio.....	77
<i>Figura 28.</i> Fotografías de generalidades del <i>Playback</i> en Biotopo. Fuente: Este estudio.....	80
<i>Figura 29.</i> Espectrogramas resultantes de las pruebas de <i>playback</i> . Fuente: Este estudio.....	82
<i>Figura 30.</i> Macho <i>E. boulengeri</i> . Visualización del saco vocal (VG). Fuente: Este estudio.....	84
<i>Figura 31.</i> Macho <i>E. boulengeri</i> . (2) Visualización del saco vocal (VG). Fuente: Este estudio...	85
<i>Figura 32.</i> <i>E. boulengeri</i> . Temblor de extremidades (TE). Fuente: Este estudio.....	86
<i>Figura 33.</i> Macho de <i>E. boulengeri</i> . Correr y saltar (CS). Fuente: Este estudio.....	88
<i>Figura 34.</i> Hembra de <i>E. boulengeri</i> . Correr y saltar (CS). Fuente: Este estudio.....	89

<i>Figura 35. Macho E. boulengeri. Correr y saltar (CS). Fuente: Este estudio.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 36. Machos de E. boulengeri. Variedad señales visuales. Fuente: Este estudio.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 37. Macho E. boulengeri. Variedad de señales. Fuente: Este estudio.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 38. Machos de E. boulengeri. Inicio de un encuentro agonístico. Fuente: Este estudio.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 39. Macho de E. cf. boulengeri. Reserva Natural Biotopo. Fuente: Este estudio.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 40. Macho de E. cf. boulengeri. Visualización de la gula (VG). Fuente: Este estudio.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 41. Espectrograma de la actividad acústica de insectos (Cicadidae) de Mar Agrícola. Fuente: Este estudio.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 42. Insectos de la familia Cicadidae en evidente estado de reproducción y desarrollo. Fuente: Este estudio.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 43. Fotografías E. narinensis y E. boulengeri. Fuentes: Mileidy Betancourth, 2016; Reserva Río Palenque y Este Estudio.....</i>	<i>101</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies y localidades de investigación.....	42
Tabla 2. Variables morfométricas empleadas.....	49
Tabla 3. Variables empleadas para la descripción de cantos en anuros.....	53
Tabla 4. Promedios de las características de las pistas para <i>playback</i>	58
Tabla 5. Variables respuesta hacia el estímulo acústico (<i>Playback</i>).....	63
Tabla 6. Rangos promedio de medidas morfométricas.....	65
Tabla 7. Descripción de variables espectrales y temporales.....	68
Tabla 8. Resumen de las principales respuestas visuales observadas.....	83

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de señalización visual en anuros. Modificado de: <i>Visual signaling in anuran amphibians communication</i> . Fuente: (Hodl & Amézquita, 2001).....	125
Anexo 2. Promedios de las medidas en variables espectrales y temporales en ambos sitios de muestreo.....	126
Anexo 3. Medidas morfométricas 24 individuos. Datos obtenidos de la colección Herpetológica PSO, Universidad de Nariño, 2018.....	126

1. INTRODUCCIÓN

La región del pacífico colombiano, alberga una extraordinaria riqueza biológica y contiene una llamativa mezcla de elementos florísticos y faunísticos ya que hace parte del chocó biogeográfico, dicha región, contiene una selva lluviosa tropical continua que la convierte en una de las regiones más diversas del planeta, la cual es producto de una serie de eventos geológico-climáticos que han interactuado a lo largo del tiempo con la biota, generando procesos de migración, extinción y especiación que aún no son del todo bien conocidos (Martínez, Gonzalez, Pilkey, & Neal, 1995). Cabe resaltar que la región del Chocó Biogeográfico figura entre las 25 regiones del mundo calificadas como prioritarias para la conservación de la naturaleza (Andrade, Gómez, & Ruíz, 1992).

Dentro de toda esa valiosa biodiversidad se destaca a una de las familias de ranas venenosas del Neotrópico (Dendrobatidae), son organismos anuros diurnos, algunos son aposemáticos otros crípticos y se distribuyen solamente en zonas húmedas de Centro y Suramérica, lo que los convierte en animales muy particulares que han mantenido fascinada a la comunidad científica por muchos años. Por esta razón, se han realizado múltiples estudios para tratar de entender sus aspectos ecológicos, fisiológicos, evolutivos y sus relaciones filogenéticas, desde diferentes áreas de enfoque como la morfología, la bioacústica, la genética, la taxonomía entre otros (Anganoy, 2014; Anganoy & Cepeda, 2017; Clough & Summers, 2000; Erdtmann & Amézquita, 2009; Grant et al., 2006, 2017; Hodl & Amézquita, 2001; Köhler et al., 2017; Mueses, Cepeda, & Moreno, 2008; Myers & Daly, 1976; Santos et al., 2014; Santos, Coloma, & Cannatella, 2003; Santos & Cannatella, 2011; Silverstone, 1976; Solís & Penna, 1997; Tarvin, Powell, Santos, Ron, & Cannatella, 2017; Vences et al., 2000), inclusive, dentro de este grupo se ha experimentado una tasa particularmente alta de descripciones de nuevas especies especialmente en las últimas

décadas, sin embargo, a pesar del gran avance científico la taxonomía y la sistemática de la familia ha sido ampliamente discutida hasta la actualidad (Grant et al., 2006, 2017; Grant & Rodriguez, 2003; Santos et al., 2014, 2003; Symula, Schulte, & Summers, 2001; Wells, 2007).

Los problemas taxonómicos de la familia, a menudo son causados por polimorfismos de color que son muy comunes dentro y entre las especies; particularmente, la bioacústica y tanto los datos ecológicos como los de comportamiento se han aplicado recientemente para tratar de resolver este tipo de problemas, al abordar un enfoque no morfológico (Brown et al., 2011; Myers & Daly, 1976). Debido a que en anuros y en muchos otros grupos animales se ha comprobado que en cada especie existe un canto típico que la caracteriza e identifica, se destaca la importancia de los estudios de las vocalizaciones, ya que hacen uso del valor de los cantos como un mecanismo de aislamiento reproductivo, en donde la capacidad de reconocerse y discriminarse entre individuos heterospecíficos y conespecíficos desempeña un papel esencial en la elección del compañero sexual, contribuyendo a la diversificación y finalmente a la especiación (Bernal, Montealegre, & Páez, 2004; Erdtmann & Amézquita, 2009; Hodl & Amézquita, 2001).

El género de dendrobátidos *Epipedobates* sensu (Grant et al., 2006, 2017), es un pequeño clado transandino, distribuido en las tierras bajas del Pacífico, y el pie de los Andes occidentales de Colombia, Ecuador y el norte de Perú, este género, ha recibido particular atención en cuanto a la delimitación de especies, debido al alto polimorfismo (p.ej., *E. tricolor* y *E. anthonyi*), a especies con morfología y coloración similar (p.ej., *E. darwinwallacei* y *E. boulengeri*) y a especies de distribución amplia (p.ej., *E. boulengeri*) entre otras (Grant et al., 2006). Además, la diferencia molecular a nivel de especies es baja, ya que se reporta dentro del género una divergencia genética de 2.6% en el gen 16S, a pesar de existir una alta divergencia acústica, lo que lo convierte en un caso desafiante para la delimitación de especies (Graham, Ron, Santos, Schneider, & Moritz, 2008;

Jungfer, 2017; Lötters, Reichle, & Jungfer, 2003; Myers, 1982; Santos et al., 2014; Santos & Cannatella, 2011; Tarvin et al., 2017). (Figura 1)

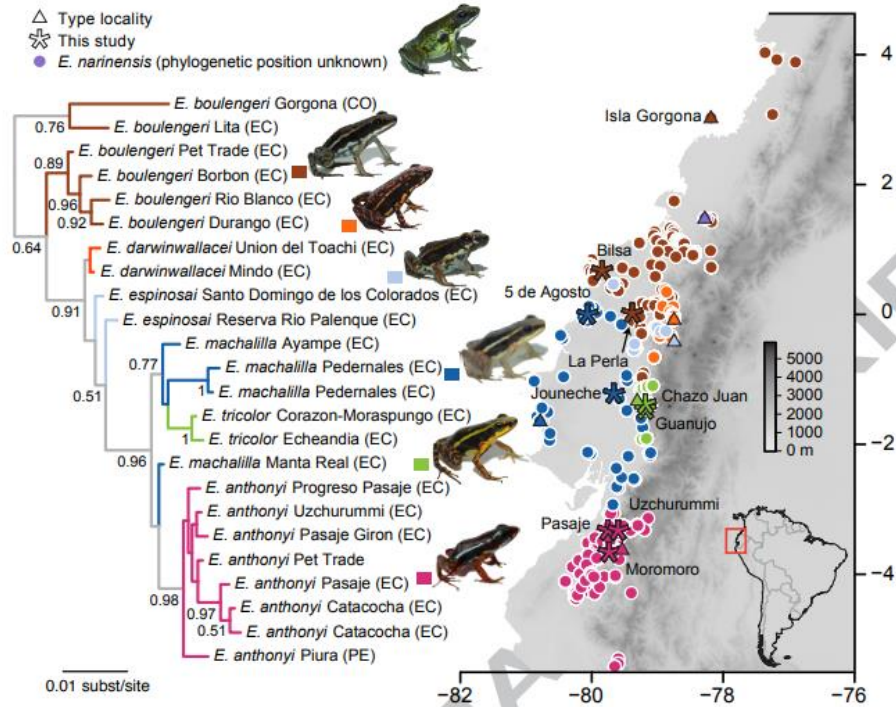


Figura 1. Siete especies de *Epipedobates* que van desde el norte de Perú hasta el sur de Colombia. Fuente: Filogenia de (Tarvin et al., 2017). La posición filogenética de *E. narinensis* actualmente es desconocida.

La delimitación de especies es un reto en el caso de especies fenotípicamente similares como estas y se hace más difícil si la meta-población de una especie ha divergido fenotípicamente recientemente, ya que es posible que en algún momento de la historia evolutiva de las especies hubo aislamiento simpátrico o alopátrico, dicha cuestión se dificulta aún más ya que las especies aposemáticas utilizan señales visuales para advertir a los depredadores de sus defensas y a menudo estas señales son copiadas y utilizadas en la comunicación intraespecífica, lo que conduce a una alta variación intraespecífica de color (Cummings & Crothers, 2013; Merrill, Chia, & Nadeau, 2014; Tarvin et al., 2017). Es así como se podría estar dividiendo una especie polimórfica en múltiples especies (sobre descifrar) o describir nuevas especies basándose en un nuevo patrón de

coloración observado (p. ej., (Cisneros & Yáñez, 2010; Mueses et al., 2008; Perez, Chavez, Twomey, & Brown, 2018). Además, varios autores expresaron sus dudas con respecto a la identidad de algunos especímenes ecuatorianos al referirse a *E. boulengeri*, y consideraron la posibilidad de que un complejo de especies pueda ocultarse dentro de este taxón nominal (Grant et al., 2006; Silverstone, 1976; Vences et al., 2003).

En el pacífico nariñense se encuentran dos especies de este género, *E. boulengeri* (Barbour 1909) y *E. narinensis* (Mueses et al., 2008). *E. boulengeri* es una especie de rana muy pequeña, con coloración dorsal variable, desde rojizo oscuro a café oscuro uniforme, con manchas irregulares más oscuras o con un patrón vetado negro, el color de fondo usualmente se torna negro hacia los muslos y la cloaca, las superficies ventrales del cuerpo y patas son blancas cremosas con un patrón vetado negro o viceversa y presentan una amplia distribución (Valle del Cauca, Colombia, hasta Noreste el de, Ecuador), presenta simpatría con otros *Epipedobates*, es similar morfológicamente y en coloración a otros *Epipedobates* (p.ej., *E. espinosai*, *E. darwinwallacei* y *E. narinensis*).

E. narinensis es una especie de rana pequeña, con medidas en hembras hasta el momento desconocidas, comparte con *E. boulengeri* una raya longitudinal medial clara en la garganta, pero presenta coloración verde oscuro, con tenues líneas ventrolaterales y laterales oblicuas de color verde claro; es endémica del departamento de Nariño y se conoce únicamente en la localidad tipo al suroccidente colombiano, departamento de Nariño municipio de Barbacoas, en la “Reserva Natural Biotopo Selva Húmeda”, la descripción de *E. narinensis* se enfocó en diferenciar a esta especie de *E. boulengeri* y *E. espinosai* principalmente, dado que son similares en su morfología (Mueses et al., 2008) lo que ha puesto en duda su estatus a nivel de especie. Posteriormente, (Anganoy & Cepeda, 2017) suministraron evidencia diferencial morfológica de las larvas entre

dichas especies, no obstante, hasta el momento no existen otros estudios que empleen diferentes tipos de evidencia que corroboren a *E. boulengeri* y *E. narinensis* como especies diferentes.

Debido a los problemas anteriormente mencionados, y haciendo uso del valor taxonómico de la bioacústica, se evaluaron los llamados de advertencia de las dos únicas especies del género reportadas hasta el momento en Colombia, *Epipedobates boulengeri* (Tumaco) y *E. narinensis* (Barbacoas), con el fin de determinar qué diferencias y similitudes existen a nivel del canto, las especies evaluadas además de ser geográficamente cercanas, tienen características similares a nivel morfológico, también se realizaron experimentos de *playback* para determinar si existe reconocimiento interespecífico del canto y evidenciar señales de respuesta acústica o visual.

Las señales de carácter visual y auditivo, son empleadas en los animales para el reconocimiento entre individuos, defensa de territorio y cortejo y son la base del estudio de la comunicación, en este sentido, los animales han desarrollado diferentes canales sensoriales y son capaces de producir una amplia variedad de señales tanto acústicas como visuales (Gerhardt et al., 2003; Kaplan, 2014). Aunque la emisión de señales acústicas (vocalizaciones) son el principal método de comunicación en los anuros, las señales visuales también resultan importantes durante las interacciones inter e intraespecíficas y esta familia no es la excepción, ya que representa un clado de anuros con un alto repertorio de señales visuales (Hodl & Amézquita, 2001). El levantamiento de extremidades y las exhibiciones de saco vocal, se han asociado a diferentes comportamientos agresivos, especialmente en las interacciones entre machos, este tipo de señales también juega un papel importante en cuanto al aislamiento reproductivo, ya que en medio de la competencia acústica intra-sexual, los machos anuros pueden mostrar diferentes tipos de comportamiento que generalmente son acompañados de señales visuales y se emplean como mecanismo de respuesta agresiva ante la presencia de otros machos (Furtado, 2017; Hartmann,

Giasson, Hartmann, & Haddad, 2005; Höbel & Gerhardt, 2003; Hodl & Amézquita, 2001; Preininger et al., 2013; Wells, 1988).

Según (Höbel & Gerhardt, 2003), las señales emitidas deben codificar una cantidad mínima de información que permita el reconocimiento intraespecífico, ya que reaccionar a señales interespecíficas como si fueran intraespecíficas (falsas alarmas) implicaría un alto costo energético que no sería necesario. Dicho reconocimiento, ocurre cuando los receptores comparan las señales detectadas con las denominadas “señales-plantilla” preexistentes en los individuos, por lo general, esto se puede comprobar mediante experimentos de reproducción (*playback*) en los que se asumen respuestas positivas cuando los receptores puestos a prueba manifiestan comportamientos conductuales, además, las señales de reconocimiento entre compañeros son rasgos complejos, compuestos de múltiples características que pueden responder de manera independiente a las fuerzas evolutivas (Erdtmann & Amézquita, 2009; Fuzessery, 1988; Gerhardt, Dyson, Tanner, & Murphy, 1994).

Actualmente, hay una creciente evidencia de cambios evolutivos en las vocalizaciones de los anuros, que podría atribuirse a procesos estocásticos como por ejemplo la deriva genética (Gerhardt et al., 2003; Panhuis, Butlin, Zuk, & Tregenza, 2001) o procesos pleiotrópicos (efectos que se derivan indirectamente de la evolución morfológica) (Cocroft & Ryan, 1995; Podos, 2001; Seddon, 2005). Es así como (Twomey, Vestergaard, & Summers, 2014), aportan una predicción clave para este problema y es que las diferencias de las vocalizaciones deberían ser mayores entre las poblaciones simpátricas (o parapátricas) frente a las poblaciones alopátricas. Sabemos que no existe una barrera geográfica en la zona de estudio, por lo tanto, las especies representan poblaciones simpátricas.

Irónicamente, este conjunto de características directamente relacionadas con la generación de diversidad está poco estudiado. Los parámetros de llamada pueden responder fácilmente a la presión selectiva para evitar la hibridación. Por lo tanto, se cree que la variación en las llamadas está asociada con la formación de especies, pero no está realmente involucrada en la diversificación a niveles más altos (P. Narins, Feng, Fay, & Popper, 2006).

Por lo tanto, evaluar el reconocimiento visual y acústico nos permite inferir si cada una de las especies en mención, ha modificado sus vocalizaciones, con el fin de evitar el reconocimiento interespecífico a lo largo del tiempo. La presente investigación, evalúa las respuestas que presentan las dos especies de *Epipedobates* (*E. boulengeri* de la granja Mar Agrícola y *E. narinensis* de la Reserva Natural Biotopo), al ser expuestas a vocalizaciones de su contraparte intraespecífica, mediante el empleo de reproducciones de *playback* del llamado de advertencia, para determinar si existe o no reconocimiento interespecífico, lo que permitirá responder las siguientes preguntas: 1) ¿Existen diferencias a nivel bioacústico entre los llamados de advertencia?, 2) Cuáles son las respuestas acústicas y comportamentales en las especies al ser expuestas a estímulos acústicos (llamados de advertencia) de su contraparte interespecífica?, 3) ¿Las evidencias bioacústicas brindan información sustancial para la delimitación de dichas especies?

2. JUSTIFICACIÓN

Los anuros neotropicales, son uno de los grupos faunísticos que actualmente requieren mayores esfuerzos de investigación científica, debido a la acelerada desaparición que presentan muchas de sus poblaciones, estas investigaciones aumentan su importancia, ya que este grupo animal, además de desempeñar múltiples papeles funcionales dentro de los ecosistemas acuáticos y terrestres, ha sido considerado en innumerables estudios como un indicador excelente de la calidad ambiental (Blaustein & Wake, 1990; Stebbins & Cohen, 1995). Sin embargo, la mayoría de los estudios en los que se sostienen estas afirmaciones se han realizado en menos del 1% de las especies conocidas (Wells & Schwartz, 2006).

Otra de las principales facultades de los anuros radica en la producción de sonidos, la cual es una de las tantas formas de comunicación animal y funciona para advertir la presencia de un individuo con respecto a otro, con diferentes fines entre ellos la reproducción y la atracción sexual, siendo esta última, la principal fuerza que ha modelado la evolución de la producción del sonido (Bradbury & Vehrencamp, 2011; Ryan, 1990; Wells, 2007; Wilczynski, Rand, & Ryan, 2001). El estudio de este tipo de señales en diferentes grupos animales, ha desarrollado una importante rama dentro de la biología como lo es la Bioacústica, que consiste en el estudio de la comunicación de los animales a través de señales sonoras, rama que ha sido ampliamente utilizada como herramienta de la sistemática, la conservación y el manejo de poblaciones, además de contribuir en la observación de procesos de especiación y selección sexual o en el diagnóstico de nuevas especies (Tubaro, 1999). Los principales avances logrados en estos aspectos de la biología han ayudado a resolver varios problemas filogenéticos en anuros, ya que el conocimiento detallado de la filogenia y los aportes a ésta, son necesarios para explicar los orígenes evolutivos de los comportamientos

y otras características, proporcionando así un marco predictivo esencial para orientar futuras investigaciones (Grant et al., 2006).

E. boulengeri (Anura: Dendrobatidae), presenta todas las características anteriormente mencionadas y se encuentra distribuida en las tierras bajas del Pacífico del sur de Colombia y el noroeste de Ecuador (Lötters, Jungfer, Henkel, & Schmidt, 2007). Especie de hábitos diurnos y terrestres, generalmente asociada a cuerpos de agua estacionarios permanentes de bosques primarios y zonas alteradas como plantaciones de banano, cultivos de palma de coco, áreas con vegetación secundaria y zonas abiertas en donde la especie puede ser considerablemente abundante (Urbina & Londoño, 2003). Por su parte *E. narinensis* es una especie recientemente descrita y conocida únicamente en su localidad tipo, al presentar muchas similitudes con *E. boulengeri*, representa una especie potencial para el estudio de la divergencia fenotípica.

Cabe resaltar, que la evidencia directa de los diferentes tipos de comportamiento, debe ser tomada en cuenta en el planteamiento de futuros proyectos de conservación en la zona, debido a que los ecosistemas en que habitan dichos individuos presentan una constante amenaza de carácter antrópico, por ende, cada uno de los datos de comportamiento obtenidos a nivel interespecífico en las dos especies del género *Epipedobates* de las tierras bajas del pacífico nariñense, enriquece el entendimiento del comportamiento y aclara las relaciones de parentesco de este grupo de anuros, también es importante resaltar, que mediante este tipo de experimentación es posible obtener evidencia directa de las complejas historias de vida características de los dendrobátidos, las cuales implican, el cuidado parental, la defensa de nidos, el transporte de larvas desde nidadas terrestres hasta los sitios de deposición acuática, la defensa del territorio, la defensa de los recursos y las estrategias de cortejo o conflicto sexual entre otras (Donnelly, 1989; Pašukonis et al., 2017; Summers, Weight, Boag, & Bermingham, 1999; Twomey et al., 2014), características son

ampliamente utilizadas para establecer estrategias de conservación en especies en peligro de extinción o en especies en donde la información documentada es limitada (Bradbury & Vehrencamp, 2011).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las respuestas acústicas y comportamentales entre *Epipedobates boulengeri* y *E. narinensis* de las tierras bajas del Pacífico Nariñense, al ser expuestas a estímulos acústicos (llamados de advertencia) de su contraparte interespecífica?

4. HIPÓTESIS

Destacándose una gran similitud fenotípica y dado que la especie *E. narinensis* está dentro del rango de distribución de *E. boulengeri* (simpatría), con base en la teoría evolutiva, se espera que si existan diferencias en los llamados de advertencia y se rechace la hipótesis de aislamiento alopatrico en la cual los cantos no deberían ser distintos entre las poblaciones, sin embargo, debido a la evidencia de una estrecha relación, también se espera que los individuos de ambas especies respondan positivamente a los estímulos acústicos de carácter interespecífico, ajustándose a un caso relativamente temprano de evolución divergente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer las respuestas acústicas y comportamentales emitidas entre *Epipedobates boulengeri* y *E. narinensis*, al ser expuestas a estímulos acústicos (llamados de advertencia) de su contraparte interespecífica en las tierras bajas del Pacífico de Nariño.

5.2 Objetivos específicos

- Describir y comparar las variables de los llamados de advertencia entre *E. boulengeri* y *E. narinensis*.
- Identificar las señales acústicas y las respuestas comportamentales entre *E. boulengeri* y *E. narinensis* emitidas al recibir estímulos acústicos de su contraparte interespecífica.
- Determinar si las diferentes respuestas obtenidas mediante los estímulos acústicos evidencian procesos de aislamiento interespecífico.

6. MARCO TEÓRICO

Con un número de 8.032 especies (16 de junio de 2019, amphibiaweb.org), los anfibios son uno de los grupos de vertebrados más diversificados y en la actualidad es uno de los clados con mayor interés para la comunidad científica debido a su elevado riesgo de extinción. (Hoffmann, 2008; Vitt & Caldwell, 2014; Wells, 2007). En Colombia, este orden se conforma por 14 familias representadas en la actualidad por 776 especies, de las cuales 93 (11,98%) hacen parte de la familia Dendrobatidae (Acosta, 2019; Frost, 2019; Medina, 2013).

6.1 Familia Dendrobatidae (Cope, 1865)

Las ranas de esta familia, son uno de los casos más extraordinarios de la evolución, sus característicos colores aposemáticos representan en muchas especies su grado de toxicidad y su comportamiento social, su reducido tamaño, las hace uno de los modelos biológicos más interesantes dentro del orden Anura (Grant et al., 2006; Lötters et al., 2007). Dentro de la taxonomía de la familia son aceptados actualmente 16 géneros y 199 especies (Frost, 2019).

La taxonomía y las relaciones de los principales clados dentro de la familia han estado en continua disputa. Myers, Paolillo O. & Daly (1991), argumentaron que los grupos con secreciones tóxicas y coloración aposemática (*Dendrobates*, *Epipedobates* y *Phyllobates*) representan un clado monofilético derivado, lo que fue respaldado por un análisis de secuencias de ADN (Clough & Summers, 2000). En contraste, estudios moleculares más completos sugieren que la coloración aposemática y la toxicidad han evolucionado independientemente hasta cinco veces, y las especies de color críptico tradicionalmente ubicadas en el género *Colostethus* en realidad pertenecen a una serie de clados separados que no están estrechamente relacionados entre sí (Santos et al., 2003; Vences et al., 2007). Además, algunas especies de *Colostethus*, como la especie centroamericana *C. pratti*, parecen estar profundamente anidadas dentro de un clado de *Epipedobates* (Santos et al.,

2003) o más estrechamente relacionadas con especies de *Epipedobates* que con otras especies de *Colostethus*. El género *Epipedobates* ha sido considerado un grupo relativamente basal, pero a diferencia de *Colostethus*, tiene piel tóxica y varias filogenias moleculares indican que este género consiste en un conjunto de linajes no relacionados (Vences et al., 2003).

6.1.1 Distribución

Se distribuyen únicamente en el neotrópico, desde Nicaragua hasta Bolivia y desde las selvas atlánticas de Brasil hasta la costa pacífica de la parte norte de sur América, incluyendo las Antillas francesas (Figura 2) (Grant et al., 2006; Vitt & Caldwell, 2014; Wells & Schwartz, 2006).

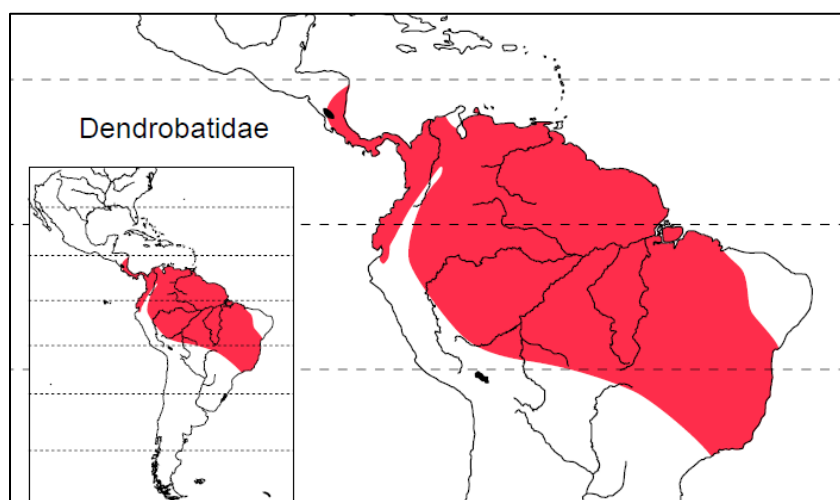


Figura 2. Distribución geográfica de la familia Dendrobatidae.
Fuente: Mapa de (Vitt & Caldwell, 2014).

6.1.2 Hábitat, historia de vida y comportamiento

Las especies de dendrobátidos, ocupan microhábitats ribereños terrestres o semi-arbores, arroyos, bosques densos, campos abiertos, bosques lluviosos de tierras bajas, bosques nublados, páramos y hábitats acuáticos, terrestres y arbóreos. Todas las especies son diurnas con excepción de una, *Aromobates nocturnus*. Todos ponen huevos terrestres, ya sea en el suelo o en bromelias y muchos se caracterizan por comportamientos reproductivos elaborados, incluido el transporte de renacuajos en el dorso de las ranas progenitoras. Estas ranas son muy activas y se pueden ver

saltando por el suelo del bosque en busca de comida. Los machos de muchas especies son altamente territoriales y participan en peleas prolongadas entre ellos. Aproximadamente un tercio de las especies conocidas podrían secretar poderosas toxinas de las glándulas dérmicas (veneno) (Grant et al., 2006; Vitt & Caldwell, 2014; Wells, 2007).

6.2 Género *Epipedobates* (Myers, 1987)

Especie tipo: *Prostherapis tricolor* (Boulenger, 1899) por designación original (Grant et al., 2006). El nombre del género proviene del griego *epipedos* que significa "sobre el suelo" y *bates* que significa "corredor" y hace referencia a la naturaleza primordialmente terrestre de la mayoría de las especies (Lötters et al., 2007; Myers, 1987). Con registros conocidos en la región del Pacífico, este género en Colombia habita en microambientes de hojarasca en bosques naturales de tierras bajas. Únicamente son conocidas dos especies para Colombia *Epipedobates boulengeri* (Barbour, 1909) y *Epipedobates narinensis* (Mueses et al., 2008).

Myers, 1987 incluyó dentro de *Epipedobates* a la mayoría de las especies de *Phyllobates* de Silverstone (1976), con la excepción de *P. bicolor*. Posteriormente, basándose en un análisis de total evidencia, Grant et al. (2006) redefinió a *Epipedobates* para incluir solamente a *P. femoralis* de Silverstone (1976) excluyendo a *P. zaparo* quien fue incluido en el grupo *Allobates* (Anganoy & Cepeda, 2017).

6.2.1 Taxonomía actual del género *Epipedobates*

Está compuesto por 8 especies (Frost, 2019): *Epipedobates anthonyi* (Noble, 1921); *E. boulengeri* (Barbour, 1909); *E. espinosai* (Funkhouser, 1956); *E. machalilla* (Coloma, 1995); *E. tricolor* (Boulenger, 1899). *E. narinensis* (Mueses, Cepeda & Moreno, 2008), *E. darwinwallacei* (Cisneros-Heredia and Yáñez-Muñoz, 2011); *E. maculatus* (Peters, 1873).

6.2.2 Hábitat, comportamiento y características morfológicas

La mayoría de las especies de *Epipedobates* no están estrechamente asociadas con las corrientes de agua y pueden ser terrestres o arbóreas. Se ha observado un comportamiento agresivo entre los machos en muchas de estas especies, tanto en campo como en cautiverio. Existe evidencia de cuidado parental y transporte de crías, reportándose en los géneros *Colostethus*, *Mannophryne*, *Allobates*, *Epipedobates*, *Phyllobates*, y *Cryptophyllobates*. Algunas especies de *Epipedobates* tienen dietas generalizadas, alimentándose en grandes cantidades de diferentes tipos de hormigas (Biavati, Wiederhecker, & Colli, 2004; Wells, 2007). En *Epipedobates*, los gránulos o tubérculos están diseminados irregularmente sobre la superficie dorsal, siendo más definidos y prevalentes hacia atrás, especialmente en la región sacra y en el muslo, en la parte anterior son ausentes o más débiles con frecuencia claramente elevados y cónicos (Grant et al., 2006).

Características morfológicas del género: (1) pérdida del pliegue metatarsiano, (2) garganta y tórax oscuros con una franja longitudinal mediana pálida en hembras y (3) abdomen color oscuro con manchas pálidas discretas. Otras características incluyen: (1) coloración dorsal críptica, marrón; (2) banda lateral presente pálida; (3) banda dorsolateral pálida presente o ausente; (4) banda ventrolateral pálida presente o ausente; (5) textura de la piel dorsal lisa o con gránulos o tubérculos dispersos irregularmente sobre las superficie; (6) tercer dedo de los machos adultos hinchado; (7) el dedo I más largo que el dedo II; (8) discos de dedos estrechos a moderadamente expandidos; (9) proceso lingual mediano ausente; (10) tubo de ventilación larval dextral; (11) forma de disco larval oral "normal" (no umbeliforme); (12) disco oral de larvas emarginado; (13) alcaloides lipofílicos presentes; (14) número de cromosomas desconocido; (16) testículos totalmente pigmentados; (17) collar de garganta oscuro ausente (Grant et al., 2006).

6.2.3 Distribución

Todas las especies de *Epipedobates* son transandinas. *Epipedobates boulengeri*, *E. espinosai*, *E. Machalilla* y *E. narinensis* se encuentran en las tierras bajas del Pacífico del norte de América del Sur. (Anganoy & Cepeda, 2017; Cisneros & Yáñez, 2010; Coloma, Ortiz, Frenkel, & Pazmiño, 2017; Mueses et al., 2008)

7. ESPECIES

7.1 *Epipedobates boulengeri* (Barbour, 1909)

7.1.1 Características morfológicas

Especie pequeña (15-21mm), con cara dorsal castaña, con manchas castaño-claras o castaño oscuras. Posee una raya dorsolateral blanco amarilla a blanca, que va desde el hocico hasta el urostilo. Los costados son castaños oscuros o negros. La cara ventral presenta un fondo crema, blanco, azulado o verdoso, moteado de negro. Posee una raya blanquecina encima de los labios, que va desde el hocico hasta la base de la extremidad anterior. El color base de la extremidad anterior es crema o castaño claro. El resto de la extremidad anterior puede ser castaño amarillento o castaño claro, con algunas marcas negras. Las patas posteriores pueden ser negras, con manchas o con rayas irregulares castaño amarillentas o castañas. Machos Longitud Rostro-cloacal promedio=16.9 mm (rango 15.0–20.0 mm; n=18); Hembras, Longitud Rostro-cloacal promedio= 18.5mm (rango 17.0–21.0 mm; n=17) (CITES, 2007; Silverstone, 1976) (Figura 3).



 **Epipedobates boulengeri**

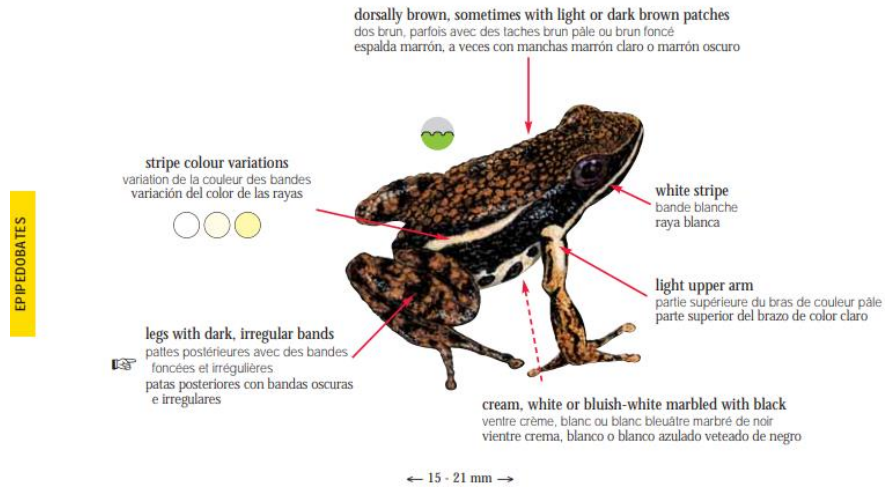


Figura 3. Descripción de *Epipedobates boulengeri*.

Fuente: Ficha de (CITES, 2007)

7.1.2 Hábitat, comportamiento y dieta

Es una especie diurna y terrestre que habita entre hojarasca, piedras, vegetación herbácea y arbustiva baja del sotobosque, generalmente asociada a cuerpos de agua en bosques primarios y zonas alteradas como plantaciones de banano, cultivos de palma de coco, y áreas con vegetación secundaria (en estas últimas la especie puede ser considerablemente abundante) (Urbina & Londoño, 2003), se han reportado hembras grávidas con entre 9 y 14 huevos, entre febrero y abril. Los machos pueden llevar hasta 6 renacuajos en su espalda y son depositados en riachuelos pequeños cerca de donde se encuentran los adultos. Su dieta es variada, incluye ácaros, coleópteros, dípteros, homópteros y colémbolos, aunque existe una alta preferencia por hormigas (Caldwell, 1996; Cisneros & Yáñez, 2010; Darst, Menéndez, Coloma, & Cannatella, 2005; Lötters et al., 2007; Silverstone, 1976).

7.1.3 Distribución

En Ecuador y Colombia habita bosques húmedos tropicales de la región del Pacífico, en los Departamentos de Cauca, Nariño y Valle del Cauca, está entre los 10-1500 metros sobre el nivel del mar, su localidad tipo corresponde a la Isla Gorgona, perteneciente al municipio del Cauca en Colombia (Acosta, 2019; Coloma et al., 2017).

7.1.4 Taxonomía y relaciones evolutivas

E. boulengeri es un nombre asignado a ranas de poblaciones de Colombia y Ecuador que podrían enmascarar un complejo de especies (Löfters et al., 2003), entre ellas *E. espinosai*, la cual es similar morfológicamente. Algunos especímenes de la zona de Tandapi y alrededores (provincia de Pichicha) fueron asignados con incertidumbre por (Silverstone, 1976) a *E. boulengeri* y ubicados en el complejo “*boulengeri-espinosai*” y aparecen como *Epipedobates sp.* en la filogenia de Santos et al., (2003). Posteriormente, esta especie (*Epipedobates sp.*) fue descrita como *E. darwinwallacei* por (Cisneros & Yáñez, 2010). Aunque *E. boulengeri* podría estar enmascarando otras especies debido a su amplia distribución y variación fenotípica, este taxón ocupa una posición basal en las filogenias de *Epipedobates*, sugiriendo que *E. boulengeri* es el taxón hermano de todo el resto de las especies dentro del género (Graham, Ron, Santos, Schneider, & Moritz, 2004; Grant et al., 2006; Pyron & Wiens, 2011; Santos et al., 2009).

7.2 *Epipedobates narinensis* (Mueses, Cepeda & Moreno, 2008)

La serie tipo, está compuesta únicamente por 12 especímenes colectados durante el mes de julio de 2006 (Mueses et al., 2008). El estado de la población de esta especie es desconocido hasta el momento. La especie está enlistada como (DD, Datos deficientes, IUCN, 2019) en vista de la limitada información sobre su extensión, estado poblacional y requisitos ecológicos. La

contaminación debido a la fumigación de cultivos ilegales es una amenaza potencial en la zona, aunque se necesita más información para determinar el impacto de esta actividad en esta especie.

7.2.1 Características morfológicas

Ranas de tamaño pequeño, machos 15.3-16.9 mm ($X = 16.3 \pm 0.6$, $n = 12$) de longitud rostro cloaca (LRC), en hembras desconocida; dedo manual I mucho más largo que II, dedo III manual engrosado; membranas basales presentes sobre los dedos pediales II-III-IV; sin pliegue metatarsal; piel del dorso finamente granular; coloración dorsal en vida verde oscuro; línea lateral oblicua pálida tenuemente definida; línea ventrolateral tenue y continua; garganta con una raya longitudinal medial clara; abdomen jaspeado con manchas a manera de puntos y/o reticulaciones oscuras. El epíteto específico hace referencia al departamento de Nariño, Colombia, como un homenaje al pueblo nariñense donde se llevó a cabo la investigación (Mueses et al., 2008). (figura 4)



Figura 4. *Epipedobates narinensis*, en localidad tipo, Reserva Natural Biotopo
Fuente: Foto de Mileidy Betancourth 2016, Foto de Fernando Santander 2019.

7.2.2 Hábitat y comportamiento

Habita selvas húmedas de tierras bajas en el pacífico nariñense. Las ranas son diurnas y se pueden encontrar entre la hojarasca. Esta especie requiere agua para completar el desarrollo larval, aunque los tipos específicos de cuerpos de agua usados para la reproducción son actualmente

desconocidos. Se han encontrado machos con dos o tres renacuajos en la espalda (Mueses et al., 2008).

7.2.3 Distribución

Especie endémica, conocida únicamente en Bosques húmedos tropicales y estribaciones occidentales del Macizo central en la región sur del Pacífico colombiano en el Departamento de Nariño entre los 540-600 metros sobre el nivel del mar, en el municipio de barbacoas, Reserva Natural Biotopo (Localidad tipo) (Mueses et al., 2008).

7.3 Diferencias entre *E. boulengeri* y *E. narinensis*

Aunque la morfometría de los individuos es muy similar, existen diferencias de coloración reportadas en la descripción original de *E. narinensis*, las cuales se mencionaron anteriormente, además, se ha reportado una Re-descripción de las larvas de *E. narinensis* y *E. boulengeri* en donde dichas larvas, se diagnostican y diferencian de tres congéneres, de otros dendrobatidos simpátricos. En esta descripción se destaca, que cada fase larvaria se caracteriza por cambios ontogenéticos en la morfología externa, y que también hay una variación morfológica dentro de cada fase de desarrollo (figura 5). Las características externas de los renacuajos de natación libre no cambian bruscamente, pero los cambios ontogenéticos ocurren en las papilas marginales, en los puntos del sistema de la línea lateral y en la coloración de la cola. Cuatro características que no se han considerado previamente distinguen grupos de especies; presencia de estante en la parte posterior de la vaina de la mandíbula superior [UJS]; muesca moderada en mediados de UJS; y tamaño de las fosas nasales; estos caracteres son sinapomorfías putativas de epipedobatos. Los renacuajos de metamorfosis tienen algunas características adultas, como el patrón de color en las extremidades traseras y las correas basales del dedo del pie, lo que facilita la identificación de las especies. (Anganoy & Cepeda, 2017)

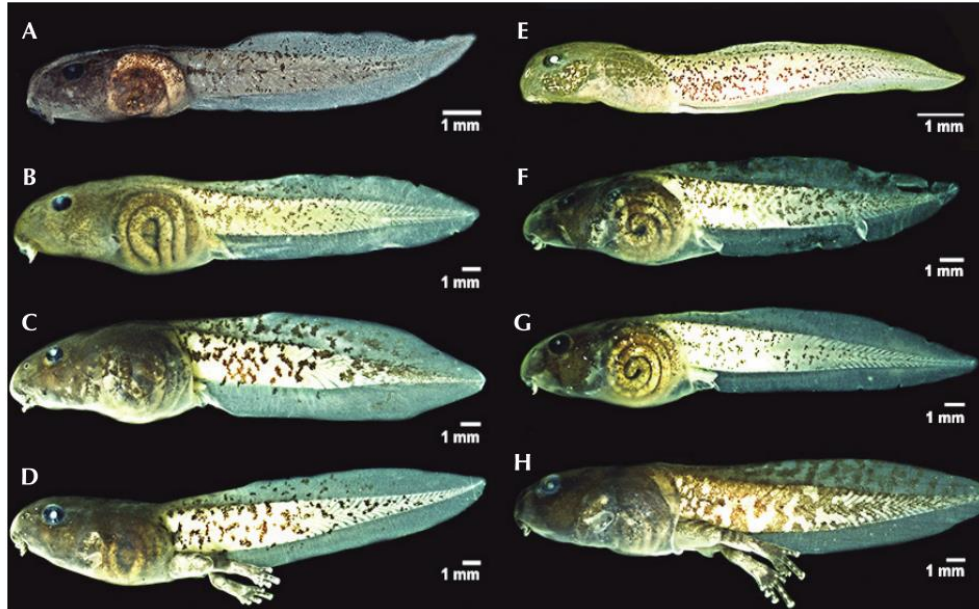


Figura 5. Variación ontogenética de los renacuajos de *Epipedobates narinensis* (A - D) y de *E. boulengeri* (E - H); Fuente: (Anganoy & Cepeda, 2017).

8. COMUNICACIÓN ACÚSTICA

El principal medio de comunicación en ranas es el sonido, tienen una gran variedad de vocalizaciones, la mayoría se utiliza para la atracción de pareja, tienen un sistema de recepción acústica sofisticado que les permite discriminar entre especies e individuos, el principal beneficio de la comunicación es la capacidad de identificar y localizar compañeros en un entorno complejo, es decir, para reconocer a un macho entre los numerosos machos que cantan y seleccionar el "mejor" por parte de las hembras; la producción de señales tiene un costo energético y un costo potencialmente mortal ya que si un conespecífico (Individuo de la misma especie) puede encontrar otro conespecífico por una señal de comunicación acústica, también lo puede hacer un depredador; en el Neotrópico, un grupo de murciélagos depredadores localiza ranas macho guiándose por los llamados, por otro lado, las interacciones sociales son esenciales para la supervivencia de un individuo y en última instancia, influyen en la aptitud evolutiva de un individuo (Vitt & Caldwell, 2014).

El mecanismo básico de producción de sonido en la mayoría de los anuros es un sistema relativamente simple. Durante el ciclo respiratorio, el aire se bombea a los pulmones por la presión positiva de los músculos de la cavidad bucal (De Jongh & Gans, 1969). Cuando los anuros cantan, el aire es expulsado de los pulmones por la contracción de los músculos en la región del tronco y se mueve a través de la laringe hacia la cavidad bucal a medida que el aire pasa a través de la laringe, la vibración de las cuerdas vocales y los cartílagos asociados producen sonido; las acciones de los músculos laríngeos dan forma a los sonidos en una variedad de formas, desde los denominados “*pips*” modulados en frecuencia hasta chillidos ruidosos y trinos; por lo general, el sonido se transmite a un saco vocal inflado que une la cavidad bucal con el ambiente exterior y sirve como un radiador de sonido, el sistema de producción de sonido involucra tres unidades funcionales principales: (1) los músculos del tronco que alimentan el sistema, (2) el aparato laríngeo que produce el sonido y (3) la cavidad bucal y el saco vocal que transmiten el sonido. (figura 6) (Wells, 2007).

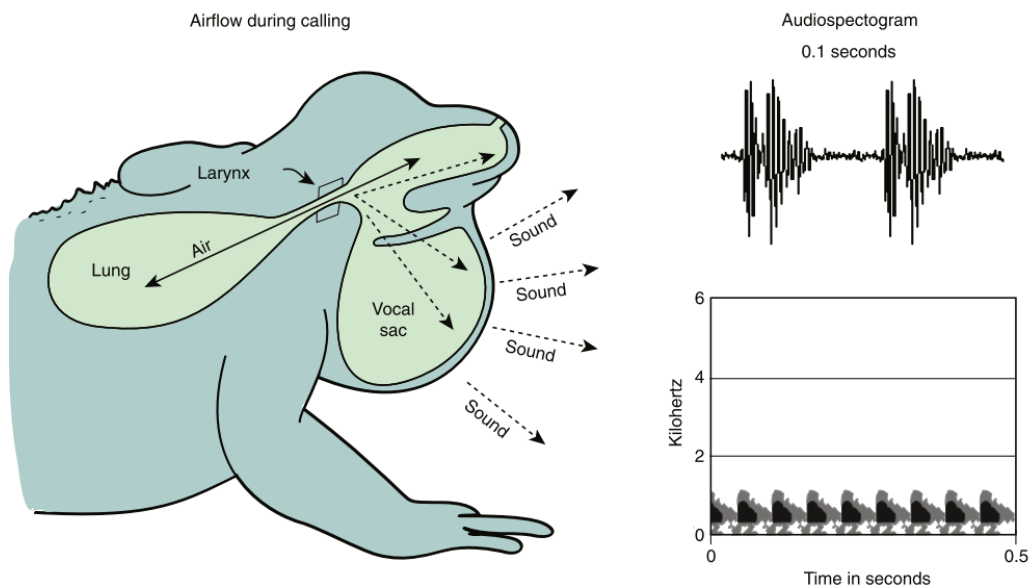


Figura 6. Producción de sonido y estructura de llamadas del sapo *Rhinella marina*. La producción de sonido utiliza el ciclo de ventilación respiratoria. (Vitt & Caldwell, 2014)

8.1 Tipos de llamados

Bogert (1960), clasificó las llamadas del orden de anuros en seis categorías, según el contexto en el que ocurren: (1) llamadas de apareamiento, (2) llamadas territoriales, (3) llamadas de liberación masculina, (4) llamadas de liberación femenina, (5) llamadas de socorro y (6) llamadas de advertencia.

Los llamados de advertencia en los anuros se pueden estudiar mediante el empleo de unidades funcionales, determinadas según los intereses del investigador, como pueden ser, 1) *Llamado o canto*: Se define a una llamada o a un canto, como la unidad acústica principal la vocalización, en los llamados de anuncio esta entidad funcional es responsable del reconocimiento de pareja. Los llamados se separan de otros llamados, por intervalos de tiempo generalmente más largos que la llamada. 2) *Nota*: Las llamadas se subdividen en notas. Estas subunidades más pequeñas casi siempre están separadas por intervalos de silencio, siendo la duración de estos intervalos, más cortos en relación con la duración de la nota. Los intervalos silenciosos y las notas son típicamente lo suficientemente largos y distintos para ser perceptibles por el oído humano. Una llamada puede tener una sola nota, si no se pueden distinguir tales subunidades. 3) *Pulso*: Las notas se subdividen en pulsos, que a su vez son la unidad más corta e indivisible de las notas (Köhler et al., 2017).

La comunicación acústica juega un papel fundamental en la reproducción de los anuros al momento de la selección sexual, por lo tanto, está involucrada en procesos evolutivos como el aislamiento reproductivo y la especiación. (Baquero, 2012) reporta que existen diferencias del canto de anuncio entre las especies del clado *Epipedobates*, con respecto a las variables espectrales de frecuencia y 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, 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*.

9. COMUNICACIÓN VISUAL

Las señales acústicas son el principal modo de comunicación en las ranas, aunque éstas también utilizan la comunicación visual y química. Además del sonido radiante, los sacos vocales también pueden servir como señales visuales, lo que puede aumentar la efectividad de las señales acústicas haciéndolas más detectables por los receptores, especialmente en entornos ruidosos. En algunas ranas, la región de la garganta y el saco vocal están notablemente coloreados, usualmente estos son colores altamente reflectantes como blancos o amarillos (P. Narins et al., 2006), aunque en Dendrobatidos generalmente son negros. Existen estudios experimentales utilizando un modelo de rana mecánica, que demostraron que la combinación de una señal acústica y una señal visual de un saco vocal en movimiento fue más efectiva para provocar respuestas agresivas de los machos de una rana dendrobátida sudamericana, la rana venenosa de brillantes muslos (*Allobates femoralis*), (P. Narins, Hodl, & Grabul, 2003).

Las señales visuales incluyen varios movimientos del cuerpo y las extremidades. Estas señales incluyen agitar las manos, levantar y bajar los pies, marcar con los pies, estirar las piernas y ondular las puntas. Además, el cuerpo puede subirse y bajarse, inflarse o balancearse de lado a lado, y pueden ocurrir cambios de color en machos o en hembras territoriales. La comunicación visual en las ranas es sin duda, más común de lo que se informa porque las señales en algunos

casos son sutiles y no son reconocidas por los observadores humanos. Hasta la fecha, la comunicación visual ha sido reportada en 10 clados de anuros. Algunas señales son notablemente similares entre clados distantemente relacionados, lo que sugiere una evolución independiente. Muchas de estas especies son diurnas y algunas viven en corrientes de montaña ruidosas o adyacentes a ellas. Los aromobátidos y dendrobátidos de color críptico utilizan varios tipos de señales visuales (Wells, 2007).

Las especies estrechamente relacionadas a menudo tienen llamadas agresivas muy similares, y en algunos casos se usan en comunicación interespecífica. La defensa de los sitios de llamada contra machos heteroespecíficos se ha documentado en dendrobátidos (Wells, 1980); en *Allobates kingsburyi* (Dendrobatidae) los machos defienden su territorio agresivamente usando señales acústicas y visuales además de combates físicos, en las hembras se evidencian comportamientos agresivos solo como signo de rechazo durante el cortejo o durante la competencia por alimento. Los machos prefieren sitios de llamadas dentro de sus territorios, ya sea en el suelo o posándose en posiciones ligeramente elevadas, como pequeñas ramas o rocas (Castillo & Coloma, 2008).

9.1 Experimentos con estímulos acústicos (*playback*)

Los experimentos de *playback* en campo o estímulos acústicos (reproducción de grabaciones previas de cantos naturales) en los machos puestos a prueba puede generar, 1) Reorientación corporal, 2) Elaboración del canto y/o 3) Comportamiento territorial agresivo. Esto se ha comprobado tanto en especies de comportamientos similares a los dendrobátidos (*Allobates femoralis* -Aromobatidae, anteriormente incluida dentro del género *Epipedobates*) como también en los grandes géneros de la familia Dendrobatidae (*Oophaga*, *Allobates*, *Colostethus*, *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Phylllobates* y *Ranitomeya*). Varios estudios incluyen información

sobre la agresividad en el sitio donde se realizan los cantos, evidenciando señales de defensa agresiva y la exclusión de los competidores potenciales en las áreas de defensa, los cantos además pueden provocar la finalización de la actividad que esté realizando un individuo, de esa manera, es posible obtener evidencia en ocasiones de acceso rápido o de redireccionamiento hacia la fuente de sonido. Esta reacción es por lo tanto, un indicador confiable del reconocimiento de intrusos conoespecíficos y hace que para ellos valga la pena incurrir en los costos potenciales asociados con la defensa territorial, lo que permite probar hipótesis acerca de la comunicación acústica en anfibios mediante el uso de experimentos de *playback*, apoyando además, estudios evolutivos de especiación, al examinar parejas de especies cercanas y la posible presencia/ausencia de barreras reproductivas (Amézquita, Castellanos, & Hödl, 2005; Amézquita et al., 2006; Hodl, 1987; Pröhl, 2005; Twomey et al., 2014)

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Ubicación del área de estudio

Las grabaciones de cantos y las posteriores pruebas de *playback* se realizaron en dos zonas del Pacífico nariñense al suroccidente de Colombia, ubicadas en los municipios de Tumaco (Zona A: Granja Mar Agrícola, *E. boulengeri*) y Barbacoas (Zona B: Entrada hacia la Reserva Natural Biotopo, *E. narinensis* (figuras 7 y 8; tabla 1)

Tabla 1. Especies y localidades de investigación.

ESPECIE	LOCALIDAD	COORDENADAS	ALTITUD m.s.n.m.
<i>E. boulengeri</i>	A. Granja Mar Agrícola (Tumaco)	01°40'49.9'' N 78°44'56.5'' W	7 - 11
<i>E. narinensis</i>	B. Reserva Natural Biotopo (Barbacoas)	01°25'52.5" N 78°16'24.0" W	483 - 519



Figura 7. Fotografía satelital del suroccidente de Colombia, departamento de Nariño, con localidades de investigación, a. Granja Mar Agrícola. b. Reserva Natural Biotopo (D \approx 59.52 Km).
Fuente: (DigitalGlobe Microsoft Corporation, 2019)



Figura 8. Fotografías aéreas de las localidades de investigación, indicando puntos de muestreo. (A) Granja Mar Agrícola. (B) Camino entrada hacia Reserva Natural Biotopo.
Fuente: (DigitalGlobe Microsoft Corporation, 2019)

10.2 Descripción del área de estudio

Las dos localidades de muestreo, se ubican al occidente del departamento de Nariño, la localidad A “Granja Mar Agrícola” se localiza en el municipio de Tumaco, vereda Lagartera a 01°40'49.9", N 78°44'56.5" W a 11 msnm, humedad relativa media anual de 89%, temperatura promedio de 27,5 °C y precipitación media anual de 2191mm (Padilla, 2014), la segunda localidad B. “Camino de entrada hacia la Reserva Natural Biotopo y alrededores carretera” se localiza en el municipio de Barbacoas, corregimiento El Diviso, vereda Berlín a 01°25'52.5" N 78°16'24.0" W entre los 483 - 519 msnm, humedad relativa media anual entre el 89-93% y temperatura promedio de 25 °C, siendo el mes de abril en el que se presenta el mayor índice de temperatura, precipitación media anual entre 6.500 y 8.000 mm (Regalado, 2011).

10.2.1 Granja Mar Agrícola (A)

La primera localidad, se encuentra clasificada como bosque húmedo tropical según (Holdridge, 1987) y está compuesta principalmente por arboles altos con dosel semicontinuo, con presencia de vegetación estratificada, la cual se distingue por un amplia diversidad biológica de plantas como *Clibadium asperum* (Asteraceae), *Cornutia odorata* (Lamiaceae), *Miconia nervosa* (Melastomataceae), *Piper aduncum* (Piperaceae), *Acnistus arborescens* (Solanaceae), *Amaranthus quitensis* (Amarantaceae), *Anthurium trisectum* (Araceae), *Geophila herbacea* (Rubiaceae), *Psychotria marginata* (Rubiaceae), *Heliconia latispatha* (Heliconiaceae), *Desmodium adscendens* y *Desmodium campyloclados* (Fabaceae); son predominantes las plantas semiepifitas como bejucos y lianas de gran tamaño, el ambiente húmedo y caluroso favorece el rápido reciclaje de los nutrientes: hongos, microorganismos e insectos descomponen con rapidez los materiales muertos que las plantas vuelven a integrar a la cadena de nutrientes. (Figura 9).



Figura 9. Aspectos del bosque tropical en (Mar Agrícola)
Fotografías de Santander y Recalde, 2019.
Fuente: Este estudio

Dentro de la Granja, existen dispersas algunas plantaciones de cacao que han sido olvidadas con el tiempo y que han generado el microhábitat predilecto y esencial para mantener numerosas poblaciones de la especie *E. bouleengeri*, la cual es muy abundante en plantaciones de banano, cacao, cultivos de palma de coco, áreas con vegetación secundaria y zonas abiertas (Urbina & Londoño, 2003), es en este tipo de hábitat en donde se realizaron las grabaciones de los cantos y las posteriores pruebas de *playback*.



Figura 10. Plantaciones en Mar Agrícola. (A) Plantaciones de cacao. (B) Cigarras (Cicadidae) abundantes en plantas de cacao en ciertos periodos, y (C) y (D) Zonas abiertas óptimas para las poblaciones dentro de las plantaciones de cacao, sector conocido como “La Chocolatera”
Fotografías de Santander, 2019, Fuente: Este estudio.

10.2.2 Reserva Natural Biotopo (B)

La segunda localidad, se encuentra ubicada en cercanías a la Reserva Natural Biotopo, cerca de la carretera y el camino de entrada hacia la reserva. El área de estudio se localiza en el flanco sur occidental de la cordillera occidental, en la cuenca baja del río Guiza, en el piedemonte costero del departamento de Nariño. Según el sistema de clasificación de (Holdridge, 1987), la Reserva Natural Biotopo Selva Húmeda se encuentra en la zona de vida bosque muy húmedo tropical (bmh-T) en donde la vegetación se estratifica de la siguiente manera.

Herbáceo: presenta una cobertura del 14%, en donde son frecuentes especies de la familia Liliaceae, Gesneriaceae, Araceae, Ericaceae, Piperaceae, Urticaceae, Cyperaceae, Cyclantaceae y Helechos; **Arbustivo:** presenta una cobertura del 12%, representado por especies de las familias

Melastomataceae, Clusiaceae, Rubiaceae, algunos géneros de la familia Arecaceae (*Synechanthus sp.*, *Calypstrogyne sp.* y *Elaeis oleifera*) **Subarbóreo**: con una cobertura aproximada del 26%, las especies más frecuentes pertenecen a las familias Rubiaceae (*Faramea cuspidata*), Clusiaceae (*Tovomita wedeliana*), Cecropiaceae (*Cecropia sp.*) **Arbóreo inferior**: Se encuentra entre los 12 y 25 m de altura y presenta una cobertura aproximada del 18%. A este estrato pertenecen la mayoría de los árboles característicos de la zona como son (*Symphonia globulifera*), (*Wettinia sp.*), (*Pouroma sp.*), (*Carapa guianensis*), (*Chamaedora sp.*) y (*Garcinia sp.*) **Arbóreo superior**: Presenta individuos con alturas que superan los 40 m y su cobertura es del 30%, está representado por *Brosimun utile*, *Otoba lehmani*, *Eschweilera rimbanchii*, *Protium sp.*, *Sacoglottis ovicarpa*, *Inga sp.* *Humiriastrum procerum* Cuatr, *Huberodendrum patinoi*; El estrato más representativo en la reserva es el arbóreo, entre las especies que más se destacan están: *Brosimun utile*, *Cecropia sp.*, *Guatteria sp.*, *Pouroma sp.*, *Coussapoa sp.*, *Symphonia globulifera*, *Sacoglottis ovicarpa* Cuatr, *Humiriastrum procerum* Cuatr, *Ocotea sp.*, *Eschweilera rimbachii* Stand, *Lecythis ampla* Miers, *Grias colombiana*, *Carapa guianensis*, *Inga sp.*, *Otoba lehmani*, *Myrcia sp.*, *Borojoa patinoi* Cuatr, *Faramea coffoides*, *Apeiba áspera*, *Aiphanes simplex* Burret, *Socratea exorrhiza*, *Chamaedora sp.*, *Matisia sp.*, *Hampea sp.*, *Huberodendron sp.* (Regalado, 2011)



Figura 11. Hábitats de Biotopo. A. Zonas conservadas, camino hacia reserva. B. Hábitat típico de *E. narinensis*, C. y D. Zonas abiertas en donde la especie habita preferiblemente los arbustales, cercanías a la carretera. Fotografías de Santander, 2019, Fuente: Este estudio.

En esta zona se detectaron hábitats de carácter arbustivo y zonas intervenidas en donde se destacan las siguientes especies: *Clusia congestiflora* Cuatr., *Tovomita cf. Weddeliana*, *Aciotis sp.*, *Psychotria sp.*, *Schefflera sp.*, *Palicourea sp.*, *Xanthoxylum sp.* y *Cyathea sp.* (Regalado, 2011).

Ambos sitios de muestreo presentan una diferencia altitudinal muy clara, comprendida entre los 7 y 519 msnm, lo que influye en los factores ambientales importantes para las especies, por lo tanto, se tomaron datos del IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales) y su atlas climatológico interactivo para evaluar los datos promedio anuales de precipitación y humedad en cada zona de muestreo con el fin de determinar diferencias (<http://atlas.ideam.gov.co>).

11. VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Teniendo en cuenta, que el tamaño corporal de los individuos está directamente relacionado con los valores de frecuencia (> tamaños = frecuencias bajas y < tamaños = frecuencias más altas) (Gingras, Boeckle, Herbst, & Fitch, 2013), se aprovecharon y se midieron individuos preservados en la colección herpetológica de la Universidad de Nariño (PSO-CZ). Para evaluar estas diferencias se seleccionaron las medidas morfométricas que muestra la Tabla 2, en donde se adicionaron las medidas comúnmente usadas en la taxonomía de dendrobátidos. Las medidas fueron tomadas mediante Calibrador, Pie de Rey Digital (150 mm/6” Discover). (Figura 12) (Salgado, 2016). En total se midieron 24 individuos (20 en *E. boulengeri* y Cuatro en *E. narinensis*) adultos sin importar el sexo; los individuos medidos de la especie *E. narinensis* corresponden a 2 paratipos de la descripción original de 2008, más dos individuos colectados en 2003, en la Reserva Natural Biotopo, los individuos de *E. boulengeri* corresponden a colectas producto de prácticas académicas realizadas anteriormente en la Granja Mar Agrícola

Tabla 2. Variables morfométricas empleadas.
Se destacan medidas recurrentes en la taxonomía de los dendrobátidos

MEDIDA (mm)	ABREVIACIÓN
1. Longitud Rostro Cloaca	LRC
2. Longitud Pie	LP
3. <i>Distancia Inter orbital</i>	IO
4. <i>Distancia Inter nasal</i>	IN
5. <i>Longitud disco del dedo pedial 3</i>	D3
7. <i>Diámetro del ojo</i>	E
8. Ancho Boca	AB
9. Ancho Cabeza	AC
10. Longitud Antebrazo	LA
11. Longitud Fémur	LF

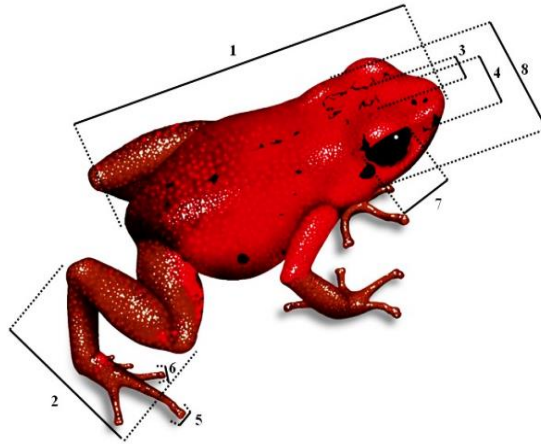


Figura 12. Medidas morfométricas en *Andinobates* (Dendrobatidae), la medida número 6 no se tuvo en cuenta en esta investigación, al considerarse redundante en *Epipedobates*.
Fuente: Ilustración Ted R. Kahn.

Debido a la diferencia en el número de individuos medidos por cada especie, y para que estos fuesen comparables se realizó una prueba paramétrica de comparación de medias utilizando una prueba *t de student* para muestras independientes.

12. GRABACIÓN DE CANTOS

Actualmente no existe un protocolo definido para el monitoreo acústico en anfibios y los distintos procedimientos dependen del objetivo planteado por el investigador y el grupo animal seleccionado (Eyman et al., 2010). En el caso de este tipo de anuros, los machos territoriales de ambas especies llaman durante el día, mientras se posan en lugares ligeramente elevados, como raíces o ramas (Vélez, Hödl, & Amézquita, 2012). Con el fin de describir, comparar variables en los cantos de ambas especies y establecer las pistas de *playback*, en ambas localidades se aplicó un muestreo aleatorio mediante recorridos libres y se realizaron grabaciones de los llamados en formato WAV de 16 bits, a una frecuencia de muestreo de 44.100 Hz, empleando el micrófono interno direccional del equipo de grabación portátil integral Roland (R 26). Las grabaciones se realizaron en este formato, debido a que este es un archivo no comprimido y almacena la

Adicionalmente, se contó con 5 grabaciones realizadas en el año 2016 correspondientes efectivamente a la especie *E. narinensis* de la Reserva Natural Biotopo por parte de la investigadora Mileidy Betancourth-Cundar (Universidad de los Andes, Bogotá) quien realizó muestreos y grabaciones en la localidad en mención, estas sirvieron para tener certeza en la descripción de los llamados de dicha especie y a partir de estos llamados se realizaron las medidas correspondientes de las variables bioacústicas temporales y espectrales.

12.1 Edición de las grabaciones

A cada una de las grabaciones obtenidas en campo, se les asignó un código de grabación con la fecha, para posteriormente realizar la edición de cada uno de los cantos mediante el software libre AUDACITY 2.3.0, con el fin de aplicar filtros de reducción de ruido o tratar de eliminar los sonidos provocados por fuentes externas (Solamente para propósitos de presentación y no de medición). Dichas grabaciones también se emplearon para realizar las posteriores pruebas de *playback*. Cabe tener en cuenta, que las ranas y sapos producen sonidos en un rango audible determinado, es decir, frecuencias que van desde los 20 Hz hasta aproximadamente los 20000 Hz (20 kHz) (Angulo, Rueda, Rodríguez, & La Marca, 2006),

13. DESCRIPCIÓN DE LOS CANTOS

A partir de las grabaciones realizadas se escogieron 10 (5 por cada especie), con la característica de tener la mayor calidad y número de cantos por individuo posibles.

13.1 Variables acústicas

El llamado, se determinó en función de sus características estructurales y es conocido como la subunidad acústica de un canto o vocalización (entiéndase canto o vocalización como la categoría más alta dentro de las características acústicas de cualquier animal), el llamado es cada

uno de los sonidos distintos y se separa de otros llamados por períodos de silencio (por lo general mucho más largos que el llamado), como se ha mencionado antes, existen varios tipos de llamados en anuros pero para este estudio se tuvieron en cuenta solamente los llamados de advertencia.

Las características tanto temporales como espectrales de las vocalizaciones fueron medidas y analizadas por la misma persona mediante la inspección visual de espectrogramas en el software Raven PRO-1.5 se utilizó el denominado *espectro de poder* que consiste en una representación gráfica de la frecuencia (KHz, en el eje *x*) y la intensidad o amplitud (db, en el eje *y*) que permite identificar la frecuencia con mayor poder o intensidad y con ello determinar la frecuencia pico (fundamental) del sonido emitido (Fenton, 2003), las variables espectro-temporales se caracterizan en la tabla 3.

Tabla 3. Variables utilizadas para la descripción de los llamados de advertencia, adaptado de (Köhler et al., 2017).

VARIABLES		PARÁMETROS	
1. Temporales	Duración, notas.	# Notas por llamado	# Pulsos por nota
2. Espectrales	Frecuencia dominante (fundamental o pico, Hz)	Frecuencia máxima (Hz)	Frecuencia mínima (Hz)

Las variables espectro-temporales que se describen a continuación se tomaron a partir de la publicación de (Köhler et al., 2017) en “The use of bioacoustics in anuran taxonomy”, siendo dichas variables fundamentales, las más utilizadas en las descripciones y comparaciones de cantos en anuros.

Temporales: *Duración notas:* La duración, generalmente se considera consistente y regular en las especies y se toma desde el inicio del primer pulso, hasta el final del último, incluyendo. *Número de notas:* La nota es conocida como la subunidad principal de una llamada inclusive, las llamadas pueden consistir en una sola nota, en esta investigación el número de notas se determinó mediante

conteos hechos directamente en los espectrogramas de los llamados generados por el software Raven Pro-1.5. y finalmente se obtuvieron los promedios generales. *Pulsos por nota*: Consisten en una sola ráfaga de energía sonora que no se subdivide más dentro de las notas. Los pulsos en las llamadas a menudo no están separados por un silencio total. El número de pulsos por nota también se contó mediante análisis visuales de los espectrogramas.

Espectrales: *Frecuencias máxima y mínima*: corresponden al número de ciclos de oscilación de las ondas de sonido por unidad de tiempo; generalmente ciclos por segundo, y se miden en Hertz (Hz) o Kilo Hertz (kHz = 1,000 Hz), la frecuencia máxima corresponde al máximo valor alcanzado por el sonido y la mínima corresponde al menor valor alcanzado en Hertz. *Frecuencia dominante*: es La frecuencia pico de la llamada (o nota); y corresponde a la frecuencia que contiene el sonido con mayor cantidad de energía, medido en Hz o kHz.

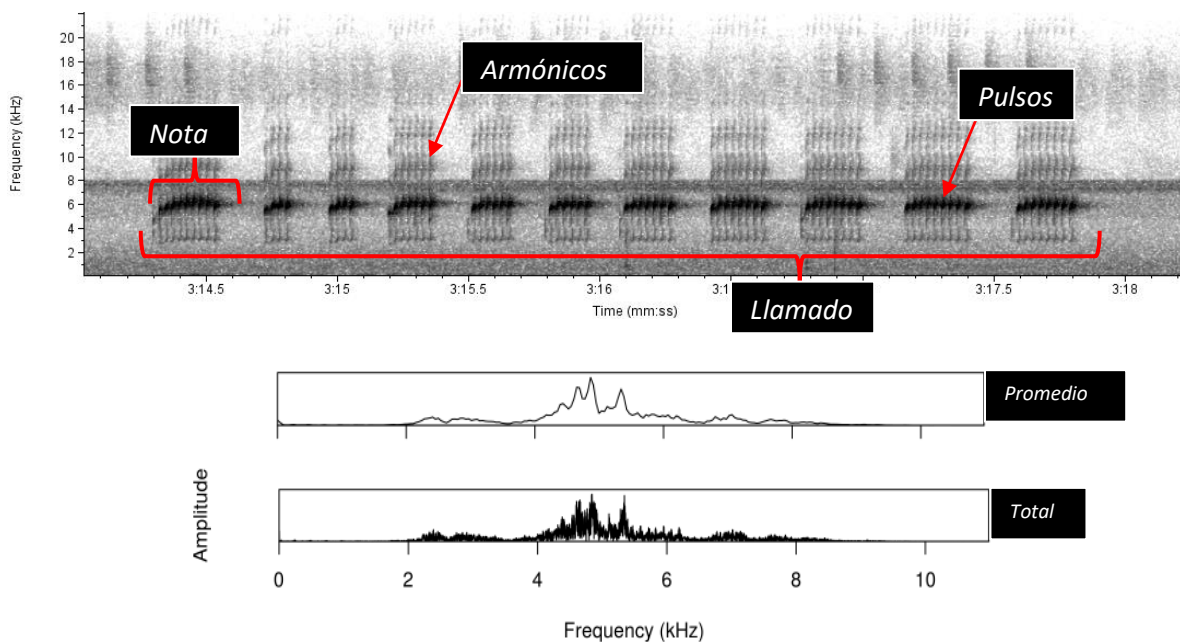


Figura 14. (Arriba) Espectrograma mostrando el llamado, nota y pulsos del canto de advertencia típico de *Epipedobates narinensis* 2016, (Abajo) espectro de poder (Amplitud vs frecuencia) en una de las notas, en Raven Pro-1.5. (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio; Jansen et al., 2017)

Finalmente, se realizó una caracterización de los cantos obtenidos en los muestreos realizados en ambas localidades para las dos especies, con base en estudios previos realizados en cantos de *E. boulengeri* (Aguilar, 2003; Amézquita et al., 2006; Baquero, 2012; Lötters et al., 2003; Pinzón, 2004; Urbina & Londoño, 2003), siendo este el primer estudio en el que se describe el canto de advertencia de la especie *E. narinensis*. Para cada una de las especies y mediante el uso de la plataforma RStudio, el programa R y los paquetes {tuneR} Ligges et al. (2013) y {seewave} Sueur et al., (2008) se realizó un espectrograma y un oscilograma de uno de los llamados de advertencia típicos, escogiéndose el canto más cercano al rango promedio, este gráfico también se realizó en una de las notas en cada llamado con el fin de observar las diferencias para cada especie a nivel de las notas.

14. ANÁLISIS DE DATOS

Con el fin de establecer si existen diferencias entre los parámetros establecidos en ambas especies, se procedió a realizar matrices de datos en el programa Excel (Office, 2016) con los valores numéricos de las variables tanto espectrales como temporales resultantes del análisis visual de espectrogramas en Raven Pro 1.5 (Frecuencias, duración, notas y pulsos) de los cantos evaluados y también de las medidas morfométricas, para posteriormente realizar promedios de cada uno de los valores en dichas variables y obtener finalmente a partir de estos un conjunto de los rangos de variación, observables mediante la visualización de su distribución en diagramas *Boxplot*, los cuales son útiles para datos de rango, amplitud, etc., en este tipo de gráfico es posible observar de forma clara la distribución de los datos y características principales como, los valores máximos y mínimos, media, mediana entre otras, ellos también permiten, comparar diversos conjuntos de datos simultáneamente y se pueden utilizar como herramienta visual para ilustrar los

datos estudiando la simetría, las colas, supuestos sobre la distribución y para comparar diferentes poblaciones (Correa & Gonzalez, 2002).

Para establecer si existe normalidad en el conjunto de datos de cada especie, se realizó un *Test de Shapiro-Wilk* para cada variable, utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVII (Statpoint Technologies, 2014), con un nivel de confianza del 95%. También se empleó la prueba *t de student* para muestras independientes, con el fin de evidenciar si existen diferencias significativas entre ambas especies. Adicionalmente, se construyeron matrices promediando los datos obtenidos a partir de las medidas morfométricas y bioacústicas, la relación de todas las variables morfométricas y bioacústicas se evaluó mediante un análisis multivariado de componentes principales (PCA) en el software PAST3 (Hammer & Ryan, 2001) evaluando la matriz en términos de varianza-covarianza. Este análisis, trata de resumir la relación entre las variables que intervienen en el análisis y su poder esta dado en la interpretación de los gráficos, evaluando las relaciones que se presentan entre X número de variables correlacionadas (que miden información común), posteriormente el conjunto original de variables se transforma en otro conjunto de nuevas variables, que no tiene redundancia en la información, llamado conjunto de componentes principales, además, este tipo de análisis es una técnica matemática que no requiere la suposición de normalidad multivariante de los datos (Pardo & Ortiz, 2014).

15. EXPERIMENTOS DE PLAYBACK

15.1 Procedencia de los audios

La experimentación de estimulación acústica intra e interespecífica, se realizó empleando la reproducción de 2 grabaciones de los llamados de advertencia previamente obtenidos para la presente investigación en las zonas de estudio ya mencionadas, en noviembre de 2018, junto a

ellas se experimentó con la reproducción de una grabación realizada a *E. narinensis* por Mileidy Betancourth-Cundar en el año 2016, en la misma localidad, la cual se utilizó con el fin de solucionar la incertidumbre en la identidad de las grabaciones de la entrada a Biotopo y así tener certeza en el *playback* aplicado del llamado de advertencia de *E. narinensis*.

En primera instancia, las grabaciones de los individuos encontrados en la entrada hacia la Reserva Natural Biotopo se habían determinado como *E. cf. boulengeri*, ya que no se había logrado tener certeza de su identificación, debido a que la simpatria de las especies aún no había sido confirmada, además, existían dudas en los patrones acústicos evidenciados en dichos llamados y eran similares a los de *E. boulengeri*. Finalmente, con el fin de determinar si las respuestas positivas ocurren efectivamente a partir de los llamados de las especies objeto de estudio, se escogió un grupo taxonómica y geográficamente externo denominado pista *Blanco*, la cual corresponde a *Pristimantis unistrigatus* (*Craugastoridae*) que fue realizada por Andrés Merino (Pontificia Universidad Católica del Ecuador) y que fueron descargadas de la base de cantos de BioWeb-Ecuador

(<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/Cantos/>).

Todas las grabaciones, se editaron mediante el software libre AUDACITY 2.3.0 en formato WAV y en ellas se ubicó un llamado de advertencia de cada especie en intervalos de silencio de entre 3 y 10 segundos completando un total de 1 minuto por pista. Los llamados escogidos para elaborar la pista de cada especie se seleccionaron teniendo en cuenta que tuviesen las medidas de frecuencia más cercanas, al promedio de frecuencias de los llamados evaluados para la descripción del canto, esto con el fin de disminuir la variación de las frecuencias a escuchar por parte de los individuos puestos a prueba. Las pistas, sus características y frecuencias se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Promedios de las características de las pistas para *playback*, intensidad de reproducción de la pista ≈ 57 db, duración pista ≈ 10 min. Grabaciones de Santander, 2018 y 2019, Fuente: Este estudio, a excepción de *P. unistrigatus* Grabado por Andrés Merino. Pontificia Universidad Católica del Ecuador y *E. narinensis 2016M* Grabado por Mileidy Betancourth

Pista-Playback Especie	Low Frec	High Frec	Peak Frec	Procedencia
<i>P. unistrigatus</i>	171,98	6136,41	2865,86	Ecuador
<i>E. boulengeri</i>	4475,66	5846,92	5415,62	Mar Agrícola – Tum.
<i>E. cf. boulengeri 2018F</i>	4205,63	6139,42	5387,21	Biotopo - Barbacoas
<i>E. narinensis 2016M</i>	4725,36	6847,81	5955,46	Biotopo - Barbacoas

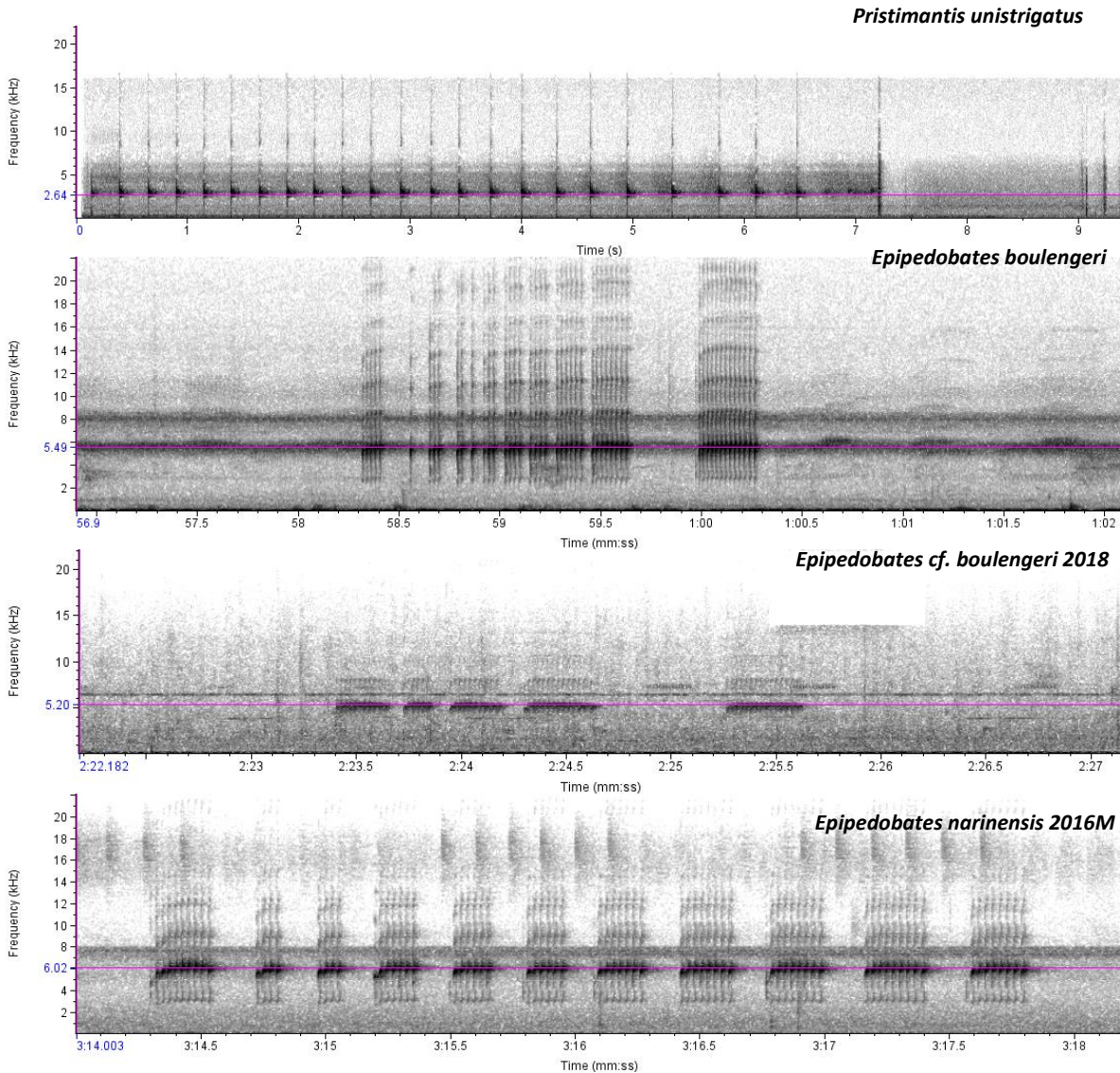


Figura 15. Espectrogramas generados en Raven Pro-1.5 de las 4 pistas empleadas para *playback*, se muestra en línea violeta la frecuencia fundamental aproximada. Grabaciones de Santander, 2018 y 2019. Fuente: Este estudio, a excepción de *P. unistrigatus* Grabado por Andrés Merino. ©Pontificia Universidad Católica del Ecuador y *E. narinensis 2016M* Grabado por Mileidy Betancourth

15.2 Aplicación de las pruebas de *playback*

La aplicación de los experimentos de estimulación acústica, se realizó en las mismas zonas donde se obtuvieron las grabaciones, los llamados de advertencia de carácter intra e interespecífico, se reprodujeron entre las mismas horas del día en las cuales se obtuvieron las grabaciones (Mañana: Entre las 07:00 y 11:00; Medio día: Entre las 11:00 y 13:00; Tarde: Entre las 13:00 y 17:00 horas) a lo largo de 3 días (por cada zona) entre el 7 y el 12 de abril de 2019.

Para ello, se ubicaron puntos potenciales de reproducción de los cantos (evidencia visual o acústica de individuos), en donde se colocó un dispositivo de reproducción audible bluetooth (parlante portable) entre 2–5 metros de distancia hasta el observador, las pistas se reprodujeron a distancia mediante dispositivo Android 6.0 SONY (reproductor digital), además, el observador se equipó con una Videocámara fotográfica NIKON D5200 + Objetivo AF Zoom 70-300mm F/4-5.6 VR. La documentación se realizó a una distancia considerable para disminuir la intervención del investigador en cada prueba. (figuras 16 y 17)



Figura 16. Esquema del montaje experimental aplicado directamente en el hábitat de las especies para determinar las respuestas a los estímulos acústicos interespecíficos.
Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio

Cada pista se repitió varias veces hasta un máximo de 10 minutos, posteriormente a la reproducción de cada pista, se dejó un tiempo de silencio de entre 4 a 5 minutos antes de la reproducción de la próxima pista. Cada una de las pruebas de *playback* tuvo una duración aproximada de 30 minutos y una vez finalizadas se procedió a buscar otro sitio potencial de cantos, en donde ya se hayan observado individuos, cada prueba de *playback* se efectuó dejando un tiempo sin reproducción de llamados de aproximadamente 15 minutos comprendido entre el final de una prueba y el comienzo de otra. En todas las pruebas de *playback* se reprodujeron las mismas las pistas, con el fin de estandarizar el método.

Por otra parte cabe resaltar, que teniendo en cuenta que los llamados en las ranas pueden ser sonidos muy fuertes y que la distancia entre los llamados y el receptor afecta la medida de las presiones del sonido ejercidas, se tuvieron en cuenta estudios como los de (Gerhardt, 1975; Passmore & Telford, 2001) quienes resumen los niveles de presión a diferentes distancias en varias anuros, dichas presiones pueden llegar a estar entre 100 y 120 dB a 50 cm de distancia dependiendo de la especie, por lo tanto, antes de cada prueba se realizó un ajuste de la presión del sonido (volumen) emitido por el parlante, ajustándose siempre entre 57 y 63 db a una distancia de entre 0,5 y 1,5 m entre el receptor y la fuente de sonido para así aumentar la naturalidad de las reproducciones, esto se determinó a partir de los decibeles medidos de cada llamado en el lugar donde se realizaron las pruebas mediante sonómetro digital Aplicación Android (SoundMeter 3.4.2) y fue el mismo rango de presión emitido en cada zona de muestreo.

Cabe destacar, que la misma experimentación se realizó en la Reserva Natural Biotopo, sin obtener señales visuales de respuesta evidentes, sin embargo, se obtuvieron respuestas de tipo acústico, las cuales se también se grabaron mediante la grabadora portable Roland (R26), para su posterior análisis.



Figura 17. Fotografías del montaje experimental aplicado directamente en el hábitat de las especies para determinar las respuestas a los estímulos acústicos intra e interespecíficos. Sector “La Chocolatera” Granja Mar Agrícola (Tumaco) abril 2019, Fuente: Este estudio

15.3 Respuestas visuales a partir del *playback*

Las respuestas visuales obtenidas mediante la aplicación del *playback* por parte de *E. boulengeri*, se anotaron y determinaron mediante la evaluación de los videos en datos categóricos y se consolidaron en tablas de contingencia de tipo nominal con valores dicotómicos y politómicos (0, 1, 2 y 3) realizando un recuento de las respuestas obtenidas en un total de 26 pruebas, evaluándose 5 tipos diferentes de respuesta en cada una de las pistas de reproducción ya

mencionadas, como se evidencia en la tabla 5; los resultados se analizaron mediante el software PAST3 y una prueba de carácter multivariado de ordenación de Escalamiento Multidimensional no Métrico (EMD-NM) empleando el índice de similitud de Gower, lo que permite representar las proximidades entre un conjunto de elementos como distancias en un espacio de un número reducido de dimensiones (López & Hidalgo, 2010). Además, se presenta un histograma realizado en GraphPad Prism 7.0 a partir de la tabla de contingencia con el recuento de las respuestas positivas y negativas obtenidas mas no del número de individuos.

Tabla 5. Variables respuesta hacia el estímulo acústico (*Playback*), aplicado en la localidad de Mar Agrícola evaluando la especie *E. boulengeri*, en respuesta a 4 pistas de *playback* de carácter intra e interespecífico.

CARACTERÍSTICA EVALUADA	VARIABLE NOMINAL
1. Salida del individuo, post <i>playback</i>: evidencia visual de algún individuo cercano a la fuente de sonido, la respuesta se evaluó teniendo en cuenta que antes de colocar el parlante hubiese individuos ocultos entre hojarasca, troncos, raíces etc., se consideró positiva cuando el individuo salió de su escondite.	Nula = 0 Positiva = 1
2. Orientación hacia la fuente de sonido: Posterior a la salida del individuo se consideró una respuesta positiva al momento de redireccionar el cuerpo hacia el parlante.	Nula = 0 Positiva = 1
3. Alejamiento: se consideró una respuesta positiva de alejamiento cuando el individuo después de salir de su escondite o direccionarse hacia la fuente de sonido emprendió la huida.	Nula = 0 Positiva = 1
4. Acercamiento a la fuente de sonido: cuando el individuo además de redireccionarse se acercó hasta la fuente de sonido en alguno de los rangos de distancia establecidos.	0 = nulo 1 = 0 a 50 2 = 50 a 100 3 = >100 cm
5. Posicionamiento sobre la fuente de sonido: cuando el individuo además de acercarse se posiciono sobre la fuente de sonido, esta categoría consideró también si el individuo además de acceder al parlante haya realizado algún tipo de señal visual evidente.	0 = nulo 1 = positivo 2 = positivo con señal visual

15.4 Evaluación de las respuestas visuales obtenidas

Las respuestas visuales obtenidas al aplicar los estímulos acústicos, fueron comparadas siguiendo los parámetros establecidos por Hodl & Amézquita, (2001) (figura 18) y se detallan en el anexo 1, para ello, se realizaron observaciones directas en campo por parte del investigador y

posteriormente se realizó un análisis minucioso de los videos obtenidos como resultado de las pruebas de *playback*, los videos se analizaron mediante el software de edición SONY Vegas Pro 13.0 (Sonic Foundry, 2014) y de ellos se extrajeron fotogramas para realizar las secuencias visuales de las respuestas observadas.

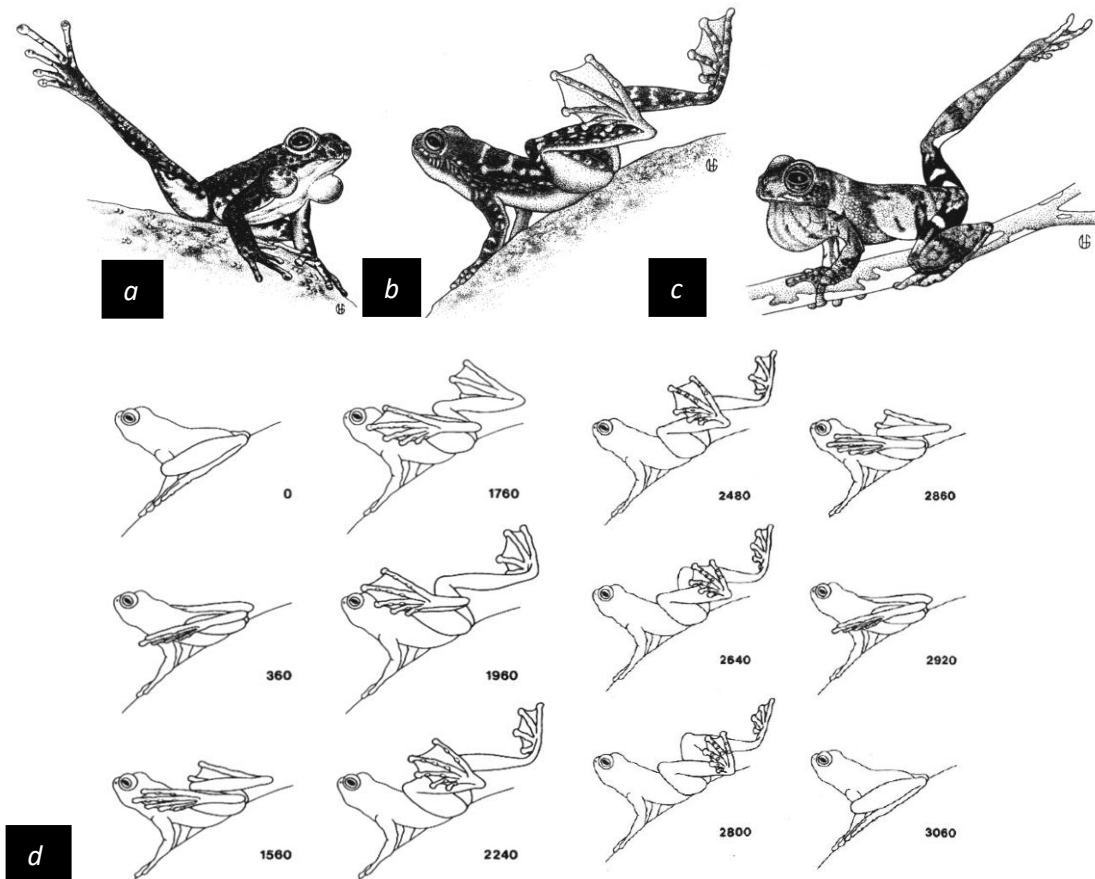


Figura 18. Levantamiento de extremidades. (A) *Foot-flagging* + vocalización en macho *Hylodes asper*. (B) *Foot-flagging* macho de *Staurois iatopalmatus*. (C). *Foot-flagging* macho de *Hyla parviceps*. (D) Secuencia del *foot-flagging* de *Staurois latopalmatus* a partir del análisis de un video. Tiempo en milisegundos después del inicio del comportamiento. Fuente: (Hodl & Amézquita, 2001).

16. RESULTADOS

16.1 Medidas morfométricas

Los resultados de las medidas morfométricas, evaluadas en ambas especies, evidencian que no existen diferencias significativas. (Ver tabla 6 y figuras 19 y 20), las medidas de todos los individuos se muestran en el anexo 3.

Tabla 6. Rangos de medidas morfométricas en (mm). Datos obtenidos de la colección Herpetológica PSO, Universidad de Nariño, 2018

Especie	LRC	AC	AB	LA	LT	LF	LP	IO	IN	D3	E
<i>E. boulengeri</i>	14	4,9	4,5	3,9	7	5,6	8	2	2	0,3	2,5
	18	6,1	5,5	5,4	8,4	8,3	9,9	2,6	2,7	0,7	2,9
<i>E. narinensis</i>	15,2	5,2	4,9	4,2	7,4	7,7	8,8	2,2	2,2	0,4	2,5
	18,3	5,8	5,2	4,6	8,2	8,2	9,9	2,4	2,5	0,7	2,8

Las diferencias y similitudes morfométricas entre ambas especies se muestran en gráficos de *Boxplot* (*Cajas y bigotes*). De esta manera, se evidenció que la morfometría aplicada en los individuos pertenecientes a las zonas de estudio, no presenta diferencias sustanciales, también se evidencia que no existen valores atípicos fuera del conjunto de datos; la mediana, medida de tendencia central que posee menos influencia de los datos extremos en *E. boulengeri*, no presenta mayor diferencia con respecto a *E. narinensis* a excepción de la variable LF (Longitud Fémur) cuya mediana claramente difiere entre ambas sin ser sustancialmente diferentes, otra diferencia a resaltar, son los valores extremos en *E. boulengeri* los cuales son más amplios que en *E. narinensis* claramente la diferencia es influenciada por el número total de individuos evaluados por especie (20 vs 4) y aunque la variación de los valores extremos puede parecer visualmente amplia en los gráficos, se debe tener en cuenta que está dada debido a pequeños cambios en milímetros, casi imperceptibles en individuos con un tamaño tan reducido.

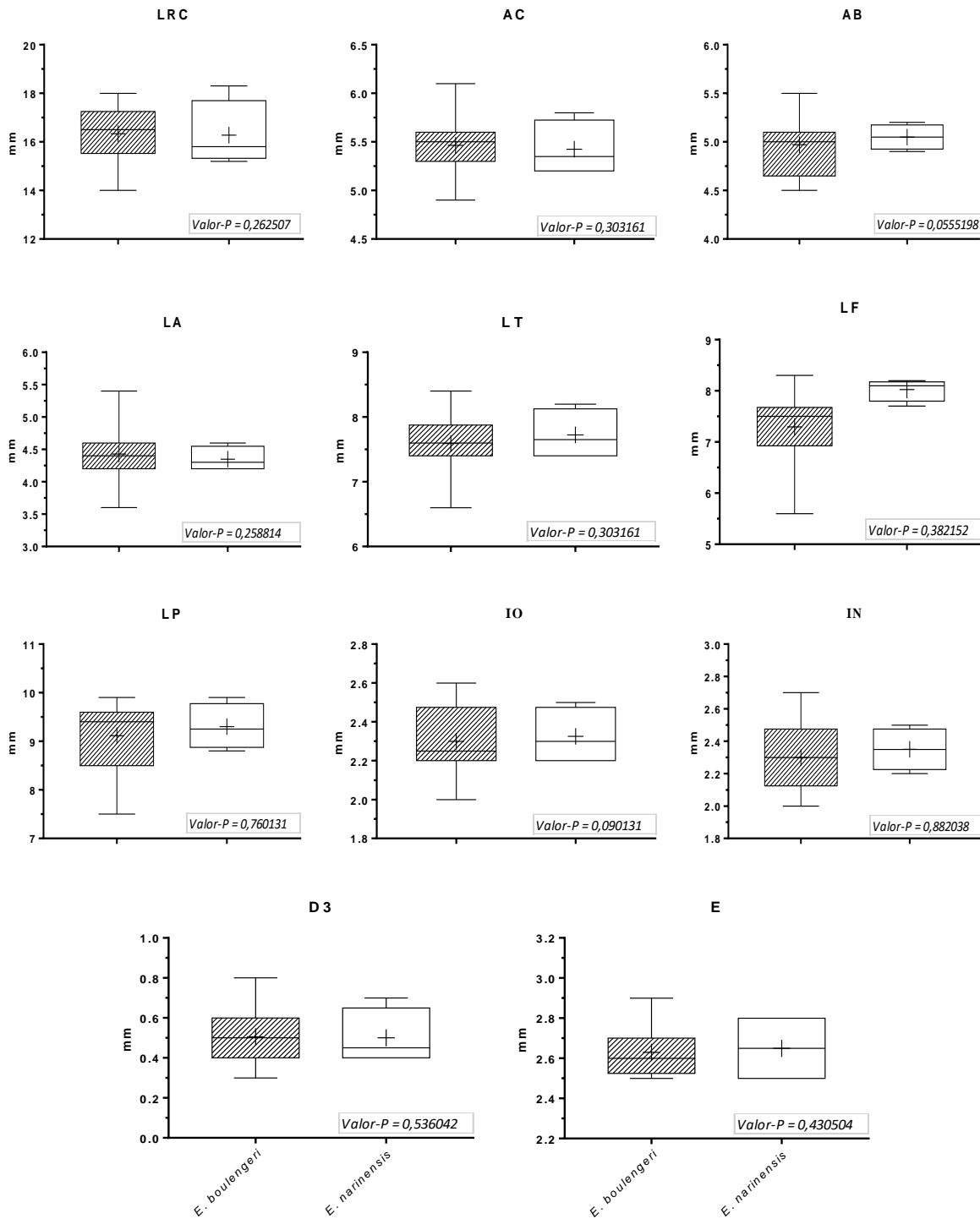


Figura 19. Diagramas *Boxplot* de variables morfométricas (mm) de *Epipedobates boulengeri* y *Epipedobates narinensis* con su respectivo *p*-valor. No existen diferencias significativas, Nivel de confianza 95%. (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

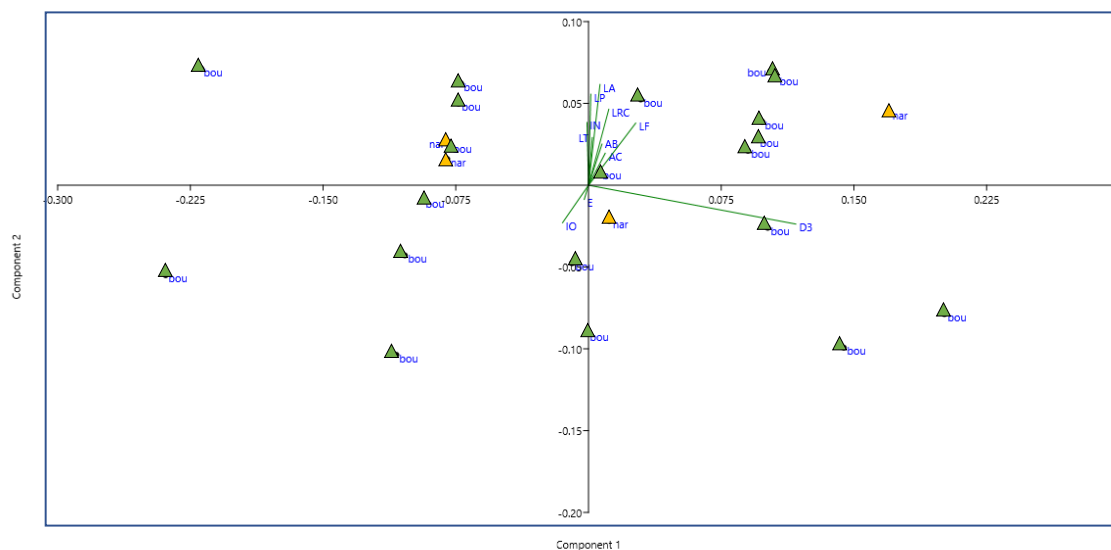


Figura 20. Análisis de componentes principales PCA, incluye variables morfométricas. Amarillo. *Epipedobates narinensis* y Verde. *Epipedobates boulengeri* (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

Como se observa en el diagrama (PCA) Figura 20, y teniendo en cuenta la morfología examinada, es posible evidenciar que el conjunto de individuos no presenta una clara separación, los individuos de ambas especies se encuentran distribuidos y mezclados dentro de todo el conjunto, individuos de *E. narinensis* se solapan en el diagrama junto a varios individuos de *E. boulengeri*, en este caso las variables con más peso dentro del análisis son: Longitud del fémur, longitud rostro-cloaca y longitud del antebrazo (LF, LRC, LA), sin embargo es consistente que la morfología no presenta diferencias sustanciales entre ambas localidades.

16.2 Grabación y descripción de los cantos

A partir de los muestreos en las dos zonas de estudio, se obtuvo un total de 21 grabaciones con una duración entre 6 y 9 minutos (Cada grabación corresponde a un individuo macho diferente) y como resultado se obtuvieron 69 llamados entre ambas especies. La tabla 7 y el anexo 2 describen en detalle los valores obtenidos en cada variable.

En ambas especies, el llamado de advertencia es de tipo pulsado (notas pulsadas), con presencia de armónicos y una estructura sencilla característica de la mayoría de dendrobátidos, el llamado es denominado *Pulsatile-harmonic* (Pulsátil armónico), cuyo sonido es una combinación de componentes tonales o armónicos, que pueden tener una importante proporción de modulación en la amplitud (Köhler et al., 2017). En ambas especies, es evidente la estructura armónica en los espectrogramas (frecuencia vs tiempo) y la modulación de la amplitud en decibeles (db) también es reconocible al observarse los oscilogramas (amplitud vs tiempo), ninguna de las especies presenta intervalos de silencio entre los picos de energía y tampoco se evidencia una modulación de la frecuencia fundamental. La variación en los valores y los detalles de los resultados en cada una de las especies se muestra en la tabla 6.

El rango promedio de la frecuencia fundamental para ambas especies oscila entre 5.395,4 y 5.919,84 (Hz), sin diferencias significativa entre ambas ($t=0,321$; $p\text{-value}=0,05$). Como resultados también se muestran 4 espectrogramas por especie, para evidenciar el rango de variación de las variables temporales y espectrales (figuras 20 y 21).

Tabla 7. Descripción de variables espectrales (Hz) y temporales en *E. boulengeri* y *E. narinensis*, junto a los rangos de los valores promedio y los valores máximos y mínimos alcanzados.

Especie <i>Epipedobates</i>	Horas canto	Temp. Ambiente C°	Periodo más caluroso del día	Tipo de Variable	Variable	Rango Promedio	Mín.	Máx.
<i>boulengeri</i>	06:00 19:00	24 - 28	11:15-16:00	Espectral	Freq Min.	4620,99 4931,77	3758,3	5088,5
					Freq Max	5944,97 6310,91	5500,1	6818,1
					Freq pico/fund.	5395,4 5749,4	5254,1	5598,6
				Temporal	Duración	0.16 - 0.30	0,017	0,917
					# de pulsos	8.8 - 16.4	1	48
					# de notas	4 - 6.8	2	11
<i>narinensis</i>	05:30 18:30	23 - 29	10:30-15:45	Espectral	Freq Min.	4641,24 4816,48	3824,4	5403,7
					Freq Max	5914,81 6862,68	5683	7137,8
					Freq pico/fund.	5412,42 5919,84	5168	6201,6
				Temporal	Duración	0.09 - 0.19	0,029	0,255
					# de pulsos	5.5 - 6.9	3	9
					# de notas	7.3 - 11.1	2	14

16.3 Descripción de los cantos de *E. boulengeri* y *E. narinensis*.

E. boulengeri: *Variables temporales*, en promedio presenta un rango de número de notas entre 4 y 6.8, la cantidad de pulsos por nota oscila entre 8.8 y 16.4, la duración de la nota está entre 0.16 y 0.30 segundos. *Variables espectrales*, la frecuencia mínima se encuentra entre los 4620.99 a 4931.77 (Hz) y la frecuencia máxima está entre 5944.97 a 6310.91 (Hz) (Ver tabla 8).

Otros aspectos relevantes para los cantos: En la granja Mar Agrícola del municipio de Tumaco, la especie *E. boulengeri* se encontró vocalizando en los alrededores de los senderos, en cercanías de fuentes de agua estacionarias y se encontró en abundancia en sectores cubiertos por hojarasca, destacando especialmente el sector conocido como “La Chocolatera” (Plantación de cacao); siempre vocaliza en las horas del día desde el amanecer antes de las 06:00 hasta el final del día 18:00 – 19:00, acústicamente más activa en periodos posteriores a pequeñas precipitaciones. Temperatura promedio de 24 a 28 °C, siendo el periodo más caluroso del día entre la(s) 11:15 a la(s) 16:00, y la hora más calurosa promedio es a las 13:30, cuando la temperatura es superior a 28 °C, registros realizados durante las grabaciones en el mes de noviembre de 2018.

E. narinensis: *Variables temporales*, en promedio presenta un rango de número de notas entre 7.3 a 11.1, la cantidad promedio de pulsos por nota esta entre 5.5 a 6.9, la duración promedio de la nota esta entre 0.09 a 0.19 segundos. *Variables espectrales*, en promedio la frecuencia mínima se encuentra entre 4641.24 a 4816.48 Hz y una frecuencia máxima entre 5914.81a 6862.68 Hz (Ver figura 22).

Otros aspectos relevantes para los cantos: En el camino de entrada hacia la reserva natural Biotopo en el municipio de Barbacoas se encontró vocalizando siempre en horas del día en los alrededores de los senderos que conducen hacia la reserva, alrededores de la carretera principal

vía a Tumaco y cercanías de cultivos, siempre oculta entre vegetación espesa y acústicamente activa entre las 05:30 hasta el final del día 18:00 – 18:30. Temperatura promedio de 23 a 31 °C, siendo el periodo más caluroso del día entre la(s) 10:30 a la(s) 15:45, y la hora más calurosa promedio es a las 13:15, cuando la temperatura es superior a 29 °C, registros realizados durante las grabaciones en el mes de noviembre de 2018.

La prueba *t de student* para muestras independientes, se empleó asumiendo que las desviaciones estándar son iguales; los *p-valores* en cada variable espectral de frecuencias (> a 0.05) determinan que no existen diferencias significativas entre ambas especies, sin embargo se pudo comprobar mediante la prueba *t de student* y los *p-valores* (< a 0.05) que si existen diferencias significativas entre ambas especies teniendo en cuenta las variables temporales (Duración de la nota, número de notas y número de pulsos por nota).

Conforme a los resultados evidenciados es posible afirmar, que las especies evaluadas presentan diferencias leves en cuanto a los valores espectrales de frecuencias y que en cuanto a las variables temporales si presentan fuertes diferencias, siendo *E. narinensis* quien produce notas más cortas en cuanto a duración y a pesar de que presenta un mayor número de notas, el número de pulsos por nota en comparación con *E. boulengeri* es sustancialmente menor. Para visualizar mejor las similitudes o diferencias se presentan gráficos de Boxplot para cada variable evaluada y un gráfico de componentes principales. (figuras, 23 y 24)

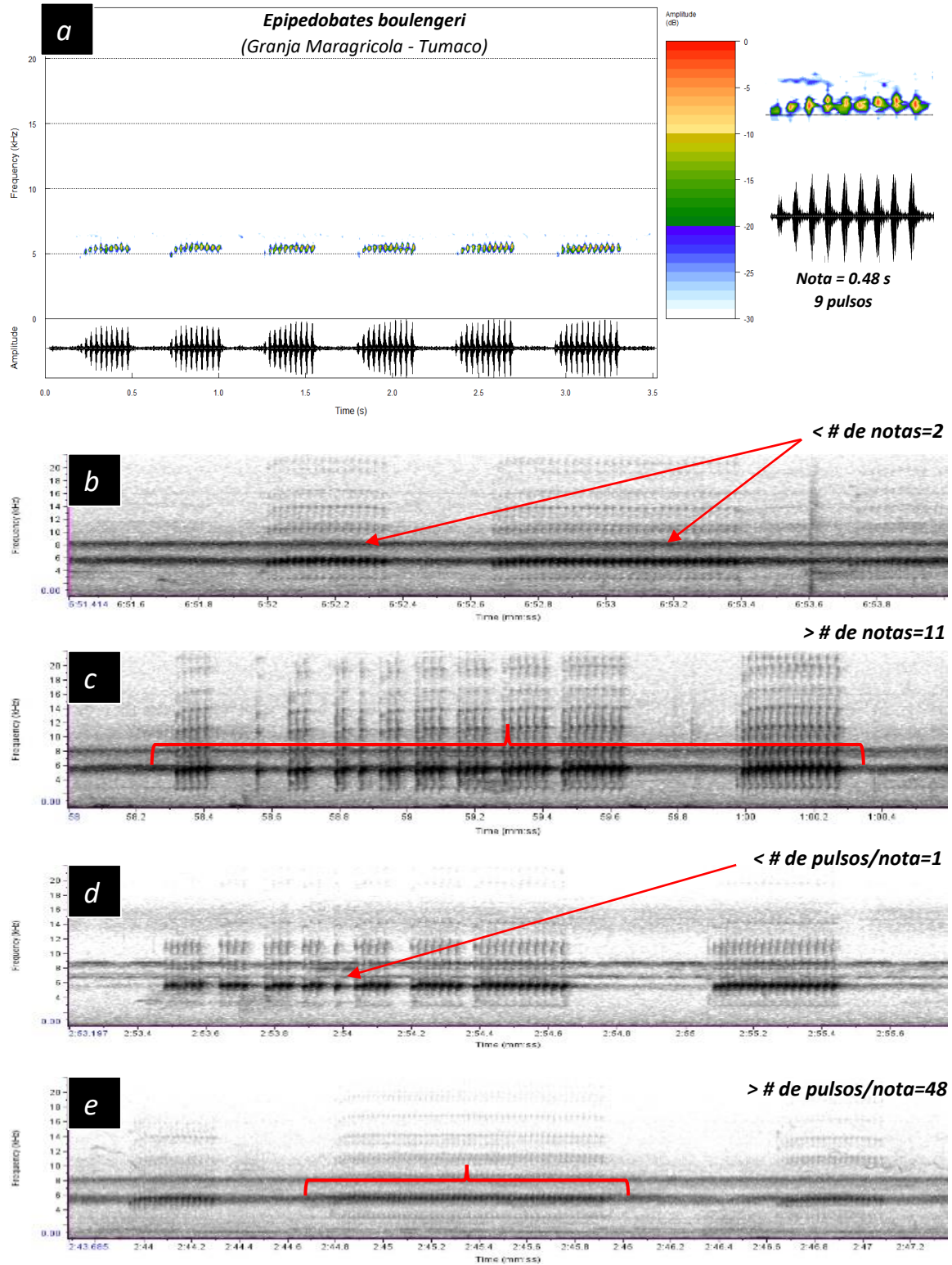


Figura 21. Espectrogramas y oscilogramas en (A) RStudio y (B, C, D y E) Raven Pro-1.5 de los llamados de advertencia en de *Epipedobates boulengeri* de la Granja Maragrícola, se muestra la variación de los llamados en cuanto a variables temporales, conteos mínimos y máximos del número de pulsos y número de notas.

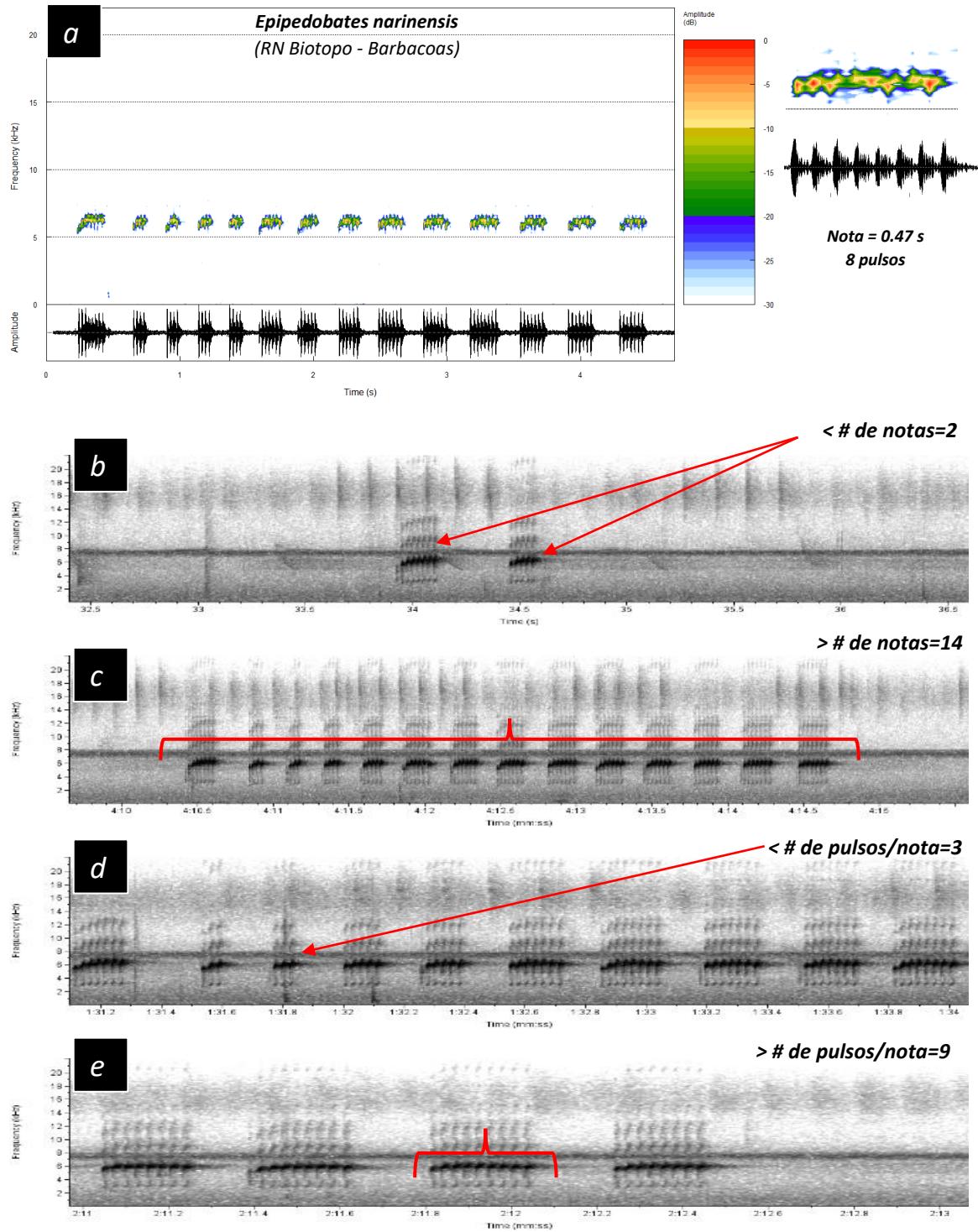


Figura 22. Espectrogramas y oscilogramas en (A) RStudio y (B, C, D y E) Raven Pro-1.5 de los llamados de advertencia en de *Epipedobates narinensis* de la Reserva Natural Biotopo, se muestra la variación de los llamados en cuanto a variables temporales y conteos mínimos y máximos del número de pulsos y número de notas.

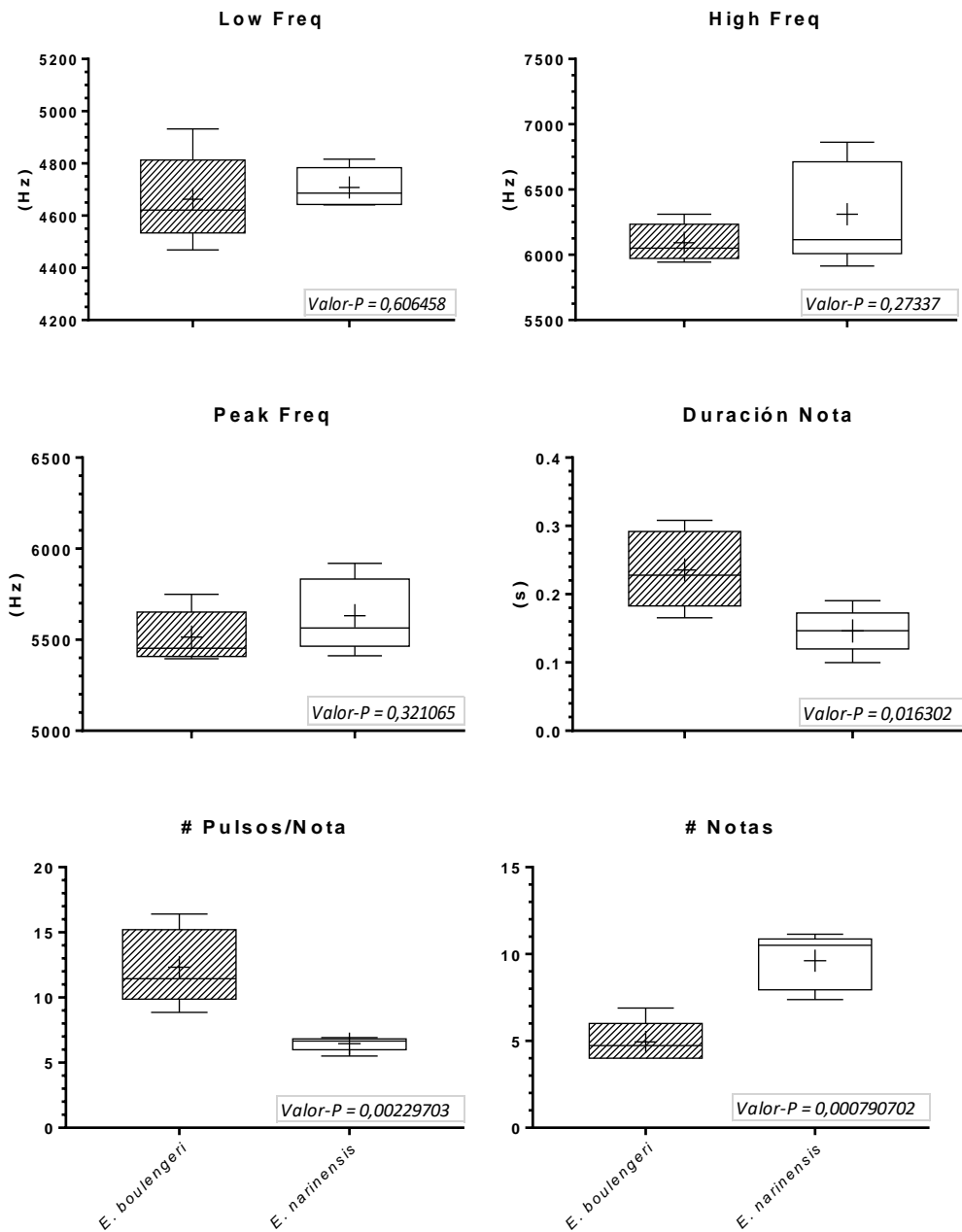


Figura 23. Diagramas Boxplot discriminando las variables acústicas espectrales y temporales de *Epipedobates boulengeri* y *Epipedobates narinensis* (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

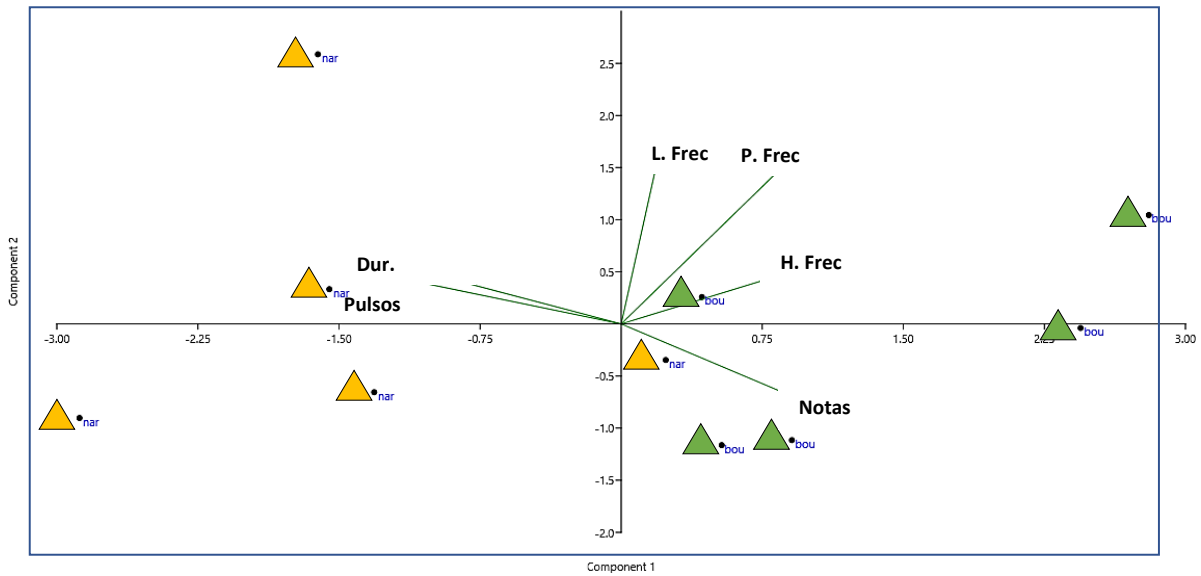


Figura 24. Análisis de componentes principales PCA, incluye variables acústicas espectrales y temporales. Amarillo, *Epipedobates narinensis* y Verde, *Epipedobates boulengeri*. Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio

El análisis de componentes principales muestra la relación en conjunto de las variables (temporales y espectrales) en los individuos evaluados de ambas especies (Figura 22). En este podemos evidenciar claramente la separación de ambas especies en términos de las variables temporales, como son, duración de la nota, número de notas y número de pulsos (Variables con más peso dentro del análisis), siendo *E. boulengeri* quien presenta en promedio mayor duración de las notas, mayor número de pulsos y menor número de notas en comparación con *E. narinensis*, quien presenta menor duración de las notas, menor número de pulsos y mayor número de notas (Figura 21).

En cuanto a las variables espectrales, no se evidencia una diferencia marcada en los valores de frecuencia mínima, pero si en cuanto a la frecuencia fundamental o pico y la frecuencia máxima ya que varía levemente entre las especies, la frecuencia máxima alcanzada por *E. narinensis*, en algunos casos puede sobrepasar los 7 KHz, a diferencia de *E. boulengeri* la cual en algunos casos solo supera los 6 KHz. En términos de frecuencia fundamental hay una clara diferencia de

aproximadamente 0.8 KHz entre especies, mientras que *E. boulengeri* puede alcanzar los 5.598,6 Hz, *E. narinensis* puede alcanzar los 6.201,6 Hz, lo que se considera una diferencia significativa teniendo en cuenta el tamaño casi idéntico de los individuos, por lo tanto para separar ambas especies en términos de variables espectrales es posible asegurar que *E. narinensis* de la localidad tipo (Reserva Natural Biotopo) en barbacoas canta a una frecuencia más alta que *E. boulengeri* de la granja Mar Agrícola en Tumaco. Para evidenciar mejor las diferencias en cuanto a las variables temporales se muestra el gráfico del análisis discriminante, en donde se observa que las variables con más peso son: el número de pulsos, el número de notas y la duración de las notas. (Figura 25)

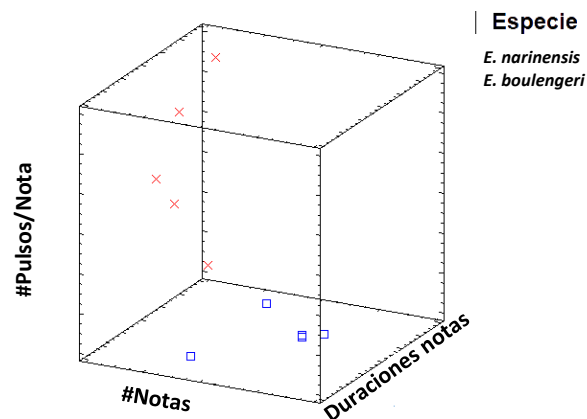


Figura 25. Análisis discriminante de variables acústicas temporales. nar. (Cuadro azul) *Epipedobates narinensis* y bou. (Equis roja) *Epipedobates boulengeri* (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

17. EXPERIMENTOS DE PLAYBACK

17.1 Granja Mar Agrícola

Los datos obtenidos mediante las respuestas de *Epipedobates boulengeri* a los estímulos acústicos por parte de *E. boulengeri* y *E. narinensis* en la Granja Mar Agrícola, permitieron asociar 5 tipos de respuestas comportamentales de carácter nominal hacia 4 pistas de *playback* diferentes. Las respuestas son: 1) Salida del individuo, 2) orientación hacia la fuente de sonido, 3) Alejamiento

de la fuente de sonido, 4) Acercamiento hacia la fuente de sonido y 5) Posicionamiento sobre la fuente de sonido, aplicando un recuento de las respuestas obtenidas, se obtuvo un histograma para evidenciar en que cantidad la especie objeto de estudio respondió a los estímulos acústicos a lo largo de las 26 pruebas realizadas (Figura 26). El histograma a partir de datos de contingencia realizado en GraphPad Prism 7.0, demuestra la relación de las respuestas positivas de *E. boulengeri* con las 4 pistas de *playback*, evidenciando que la pista blanco no obtuvo relevancia en el número de respuestas y se destaca que la característica número 1 evaluada, “salida del individuo post *playback*”, es la que mayor número de respuestas positivas obtuvo, evidenciando además que los llamados de *E. narinensis* 2016 y *E. cf. boulengeri* 2018, tienen respuesta por parte de los individuos de *E. boulengeri* evaluados. En su orden le siguen las respuestas positivas de orientación, acercamiento y posicionamiento, por otro lado, el alejamiento de los individuos no tuvo relevancia en los datos obtenidos.

Como era de esperarse, la pista *blanco* que corresponde a un individuo de *Pristimantis unistrigatus* del Ecuador no obtuvo ningún tipo de respuesta visual, pasando desapercibida por los individuos observados, a excepción de la prueba número 10 en la que uno de los individuos se alejó del sitio después de haber realizado la reproducción de la pista *blanco*, esto no evidencia una respuesta hacia el estímulo puesto a prueba. Al observarse el gráfico de “Escalamiento Multidimensional no Métrico” (EMD-NM) (Figura 27), se evidencia una clara relación negativa entre los individuos de *E. boulengeri* y la pista *Blanco*, la separación hacia la izquierda en el gráfico así lo demuestra. En cuanto a las dos pistas de reproducción de los llamados de anuncio de carácter interespecífico de la especie *E. narinensis* podemos observar la evidente relación de ambos cantos, hacia las respuestas visuales, ubicándose hacia la derecha del gráfico, demostrando así, una relación positiva hacia el estímulo acústico (*playback*). Como también era de esperarse, las

respuestas obtenidas a partir del llamado intraespecífico grabado en la misma zona de muestreo, refleja una marcada respuesta positiva, la cual es observada hacia la derecha de la Figura 27, de este modo, se demuestra que la especie *E. boulengeri* responde positivamente y de manera directa hacia los estímulos acústicos intra e interespecíficos, lo que no necesariamente refleja que ambas especies sean una sola como se explica en la discusión de estos resultados.

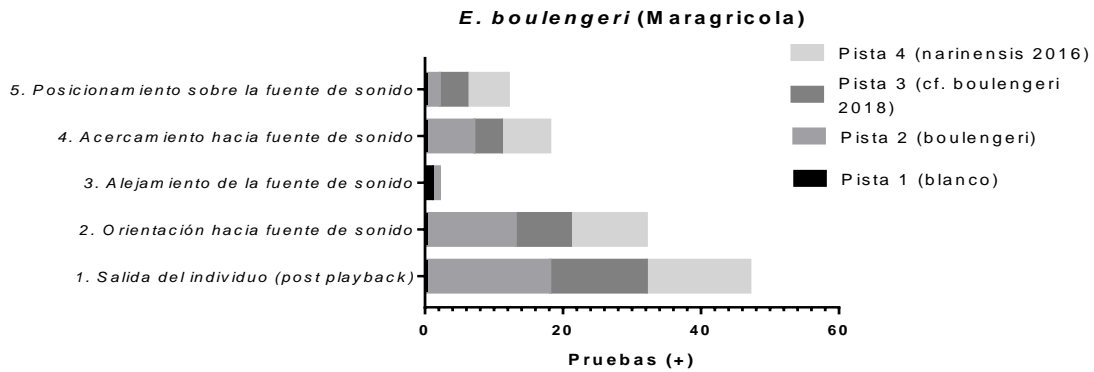


Figura 26. Histograma a partir de datos de contingencia en las pruebas de *playback* aplicadas hacia *E. boulengeri*, incluye las características evaluadas y el número de pruebas positivas obtenidas. Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio

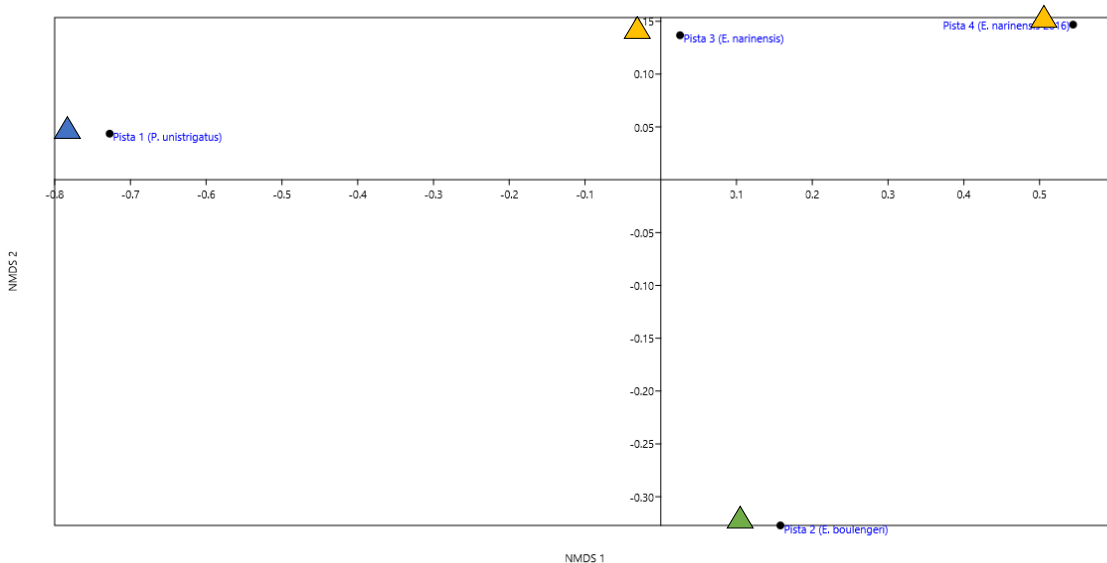


Figura 27. Escalamiento Multidimensional no Métrico (EMD-NM). Relación de *E. boulengeri* (Tumaco) con cada una de las pistas empleadas para el *playback*. Azul, *P. unistrigatus*. Amarillo, *E. narinensis*. Verde, *E. boulengeri* (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

Uno de los resultados más interesantes y que se pudo documentar en video, fue la respuesta de 2 individuos machos de *E. boulengeri* hacia el llamado de *E. narinensis*. Al realizarse la prueba de *playback* número 18 (09:30 h) los individuos al sentirse atraídos por el estímulo acústico de *E. narinensis*, se encontraron cerca de la fuente de sonido, lo que resulto en una interesante evidencia audiovisual de conflicto en machos (encuentro agonístico), lo cual es característico de la especie y de la familia, evidenciando el despliegue de dos tipos de comportamiento visual, como el levantamiento del cuerpo y la visualización de la gula, lo que hace más interesante aun el resultado es que uno de los machos en mención, presentaba el característico acarreo de renacuajos. Posterior a la prueba fue posible fotografiar y contar el número de renacuajos en la espalda, el cual fue de 12 individuos (Figura 28 b, 36 y 38).

Un total de 12 individuos de *E. boulengeri* fueron observados accediendo a la fuente de sonido, reorientándose y posicionándose encima del parlante que emitía el estímulo, evidenciando saltos, movimiento de extremidades traseras, elevamiento del cuerpo y despliegue de gula, resultados que se caracterizaron mediante las señales visuales de respuesta propuesta por (Hodl & Amézquita, 2001). 19 individuos de *E. boulengeri* fueron observado acercándose hacia la fuente de sonido en diferentes distancias y ángulos siendo el acercamiento más común, entre los 0 y 50 cm de distancia entre el individuo y la fuente de sonido. Solamente un individuo se alejó de la fuente de sonido al reproducir el canto de *E. boulengeri*, esto pudo suceder esporádicamente ya que no se volvió a observar dicho comportamiento. 31 individuos evidenciaron la salida desde su lugar de escondite y presentaron algún tipo de redireccionamiento del cuerpo en orientación hacia la fuente de sonido, lo que cual fue una respuesta positiva de carácter intra e interespecífico, ya que 18 de ellos respondieron de manera positiva hacia los llamados de *E. narinensis* y 13 individuos respondieron positivamente hacia el llamado conespecífico (Figura 26).

Uno de los individuos puestos a prueba presento respuestas positivas visuales hacia los cantos intra e interespecíficos como levantamiento de extremidades posteriores, despliegue de gula y acceso a la fuente de sonido. El individuo se encontraba sobre un nido de hormigas, lo que sugiere que en esta especie también hay defensa de su territorio de alimentación.

Cuando el estímulo solo fue por parte de *E. narinensis* hacia *E. boulengeri*, se observó 3 individuos directamente debajo de la fuente de sonido. Estos ejemplares no mostraron evidencia de movimiento de la gula, sugiriendo que eran hembras las que respondían al estímulo, por esta razón, fue necesario coleccionar uno de aquellos individuos, codificado como (JFS-024) y los resultados del sexaje muestran que es una hembra, con evidencia clara de madurez sexual, puesto que se evidencio en estado de gravidez, al poseer 7 huevos ováricos y una gran cantidad de vitelo. De este modo es posible determinar, que las hembras de *E. boulengeri* tienen receptividad hacia los machos de *E. narinensis* (Figura 28, A, E y F).



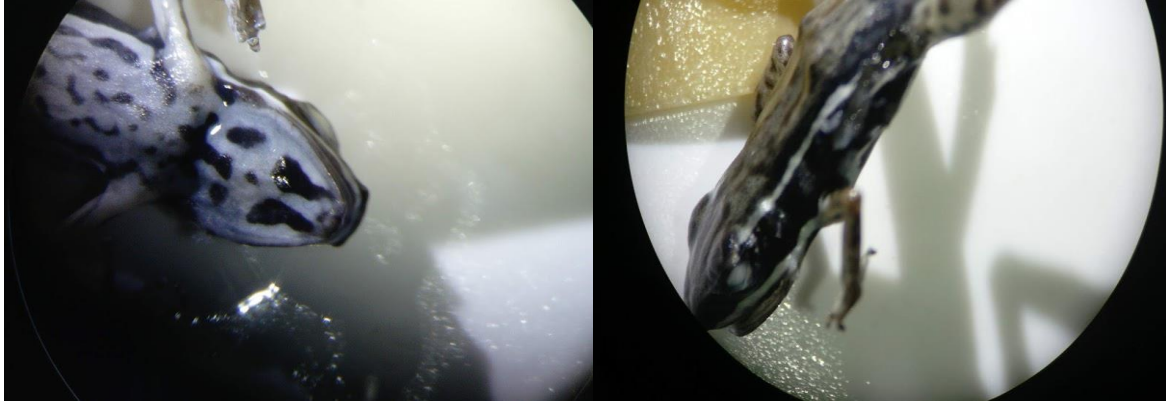


Figura 28. **A.** *E. boulengeri* (hembra) acceso a la fuente de sonido. **B.** *E. boulengeri* (macho) con acarreo de renacuajos (Total=12); **C.** Individuo al salir de su escondite post-playback; **D.** Individuo acercándose hacia la fuente de sonido; **E.** y **F.** Individuo sexado en laboratorio (JFS-024). Mes de abril de 2019, Granja Mar Agrícola. Fotos de Santander, 2019. Fuente: Este estudio

17.2 Reserva Natural Biotopo (Barbacoas)

Debido a los hábitos crípticos de *E. narinensis*, en esta localidad no fue posible observar directamente a los individuos de esta especie para así evaluar las respuestas comportamentales. No obstante, los individuos realizaban llamados en lugares de muy difícil acceso. Los cuatro estímulos acústicos fueron expuestos y emitidos a estos ejemplares de *E. narinensis* que llamaban desde su microhábitat. Se obtuvo pocas respuestas, tales como cantos, redireccionamiento y huida, las cuales quedaron registradas en los videos, lo que permitió determinar a dichos individuos cómo *E. cf. boulengeri*. La incertidumbre de su identificación taxonómica recae en que únicamente la observación no es suficiente para determinar con certeza la especie debido a los problemas de polimorfismo y similitud entre las especies que presenta este género. De determinarse que estas poblaciones si pertenecen a *E. boulengeri* en vez de *E. narinensis*, entonces las dos especies estarían en simpatria. Esto implica que las especies modifiquen su canto considerablemente (Amézquita et al., 2011; Gerhardt et al., 2003; Höbel & Gerhardt, 2003; Köhler et al., 2017).

A pesar de ello, también se realizaron grabaciones acústicas de los llamados respuesta a los estímulos acústicos, las cuales se evaluaron mediante la examinación de espectrogramas, así fue

posible determinar diferencias marcadas en términos de frecuencias entre los cantos de *E. narinensis* de 2016 y los registros acústicos actuales de *Epipedobates cf. Boulengeri* 2019, evidenciándose en promedio un número alto de pulsos, igual a 33, llegando incluso hasta los 50 pulsos por nota, además, el número de notas promedio esta entre 4 y 6, característica solo vista en los llamados de *E. Boulengeri*. Por otra parte, las frecuencias fundamentales y máximas de *E. cf Boulengeri* 2019 resultaron notoriamente más bajas, lo que también es similar en los patrones de los llamados de *E. Boulengeri* como se muestra en los espectrogramas, por lo tanto al determinarse que la población que estaba siendo determinada como *E. cf. Boulengeri* de los alrededores de la carretera y caminos de entrada hacia la reserva, corresponden realmente a poblaciones de *E. Boulengeri*, presentándose una evidencia clara de la simpatria de ambas especies en este lugar (Figura 29)

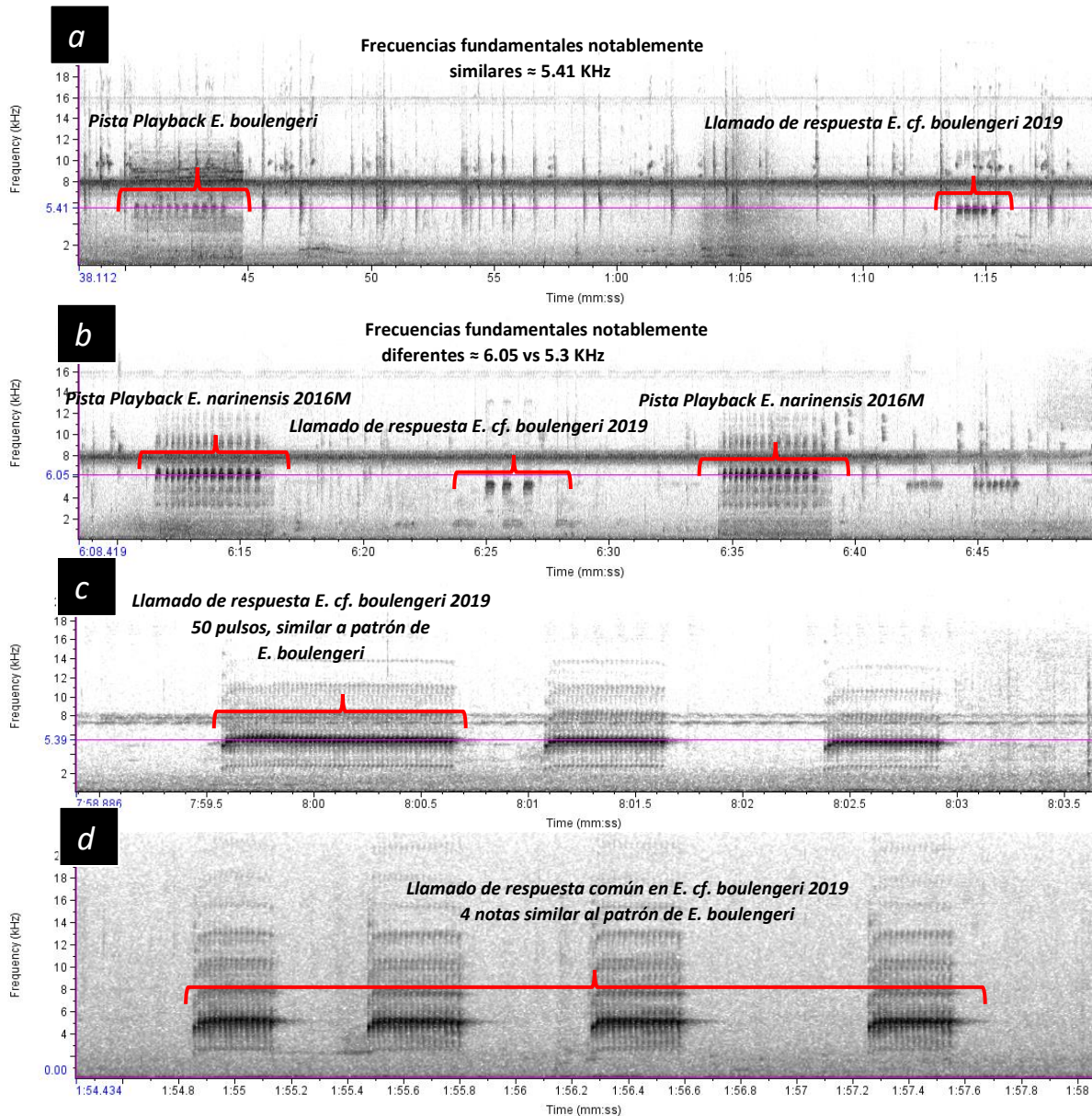


Figura 29. Espectrogramas resultantes de las pruebas de *playback*. **A.** *E. boulengeri* vs *E. cf. narinensis* (nótese frecuencias iguales). **B.** *E. narinensis* 2016M vs *E. cf. Boulengeri* 2019 (nótese frecuencias diferentes). **C.** Nota de 50 pulsos en *E. cf. Boulengeri* 2019, promedio de pulsos = 33. **D.** Llamado con 4 notas en *E. cf. Boulengeri* 2019. Sector, Sendero Reserva Natural Biotopo (Barbacoas) abril 2019, Fuente: Este estudio.

17.3 Descripción de las respuestas visuales

Mar Agrícola (Tumaco)

Las respuestas visuales, se determinaron a partir del análisis de los videos capturados en ambas zonas de muestreo y resultaron ser más evidentes en la Granja Mar Agrícola, las respuestas

fueron mixtas, es decir, en una sola interacción se evidenciaron varias señales, las respuestas obtenidas en la Reserva Natural Biotopo fueron muy escasas y en su mayoría se evidenciaron respuestas solamente con cantos, las señales visuales se presentan como secuencias de varios fotogramas empleando el zoom digital del software, en donde también se incluyó la duración de la señal 00:00:00/min:seg:ms, la tabla que se incluye a continuación, resume los resultados de las respuestas observadas y documentadas, además, cada una de las señales documentadas cuenta con un link de acceso a los videos para la visualización de dicha señal o interacción.

Tabla 8. Resumen de las principales respuestas visuales observadas y documentadas durante los experimentos de estímulo acústico intra e interespecífico.

RESPUESTA VISUAL	ESPECIES INVOLUCRADAS	DURACIÓN PROMEDIO (S)	NÚMERO DE REGISTROS
Visualización del saco vocal (VG)	Ambas	0.007	8 en respuesta a <i>E. boulengeri</i> 5 en respuesta a <i>E. narinensis</i>
Temblor de extremidades (TE)	<i>E. boulengeri</i>	0.004	2 en respuesta a <i>E. narinensis</i>
Correr y saltar (CS)	<i>E. boulengeri</i>	No determinado	6 en respuesta a <i>E. narinensis</i> 3 en respuesta a <i>E. narinensis</i>
Levantamiento del cuerpo (LC)	Ambas	No determinado	3 en respuesta a <i>E. boulengeri</i> 2 en respuesta a <i>E. narinensis</i>
Conflicto agonístico	<i>E. boulengeri</i>	67.8	1 en respuesta a <i>E. narinensis</i>

***Epipedobates boulengeri* (Granja Mar Agrícola)**

1. Visualización del saco vocal (VG) *Throat display*: Inflar el saco vocal, se puede observar después de adoptar una postura erguida. Puede o no, acompañarse por algún tipo de vocalización, en este caso la señal se acompañó del redireccionamiento hacia la fuente de sonido acercándose finalmente a esta, en una ocasión se presentó respuesta con vocalización y las respuestas se dieron a partir de las pistas de *playback* con el llamado de *E. narinensis* 2016M y *E. boulengeri*. Duración de la señal: 00:00:07ms. (Figuras 30 y 31)

Links de acceso a videos. <https://cutt.ly/VYgu8Y>

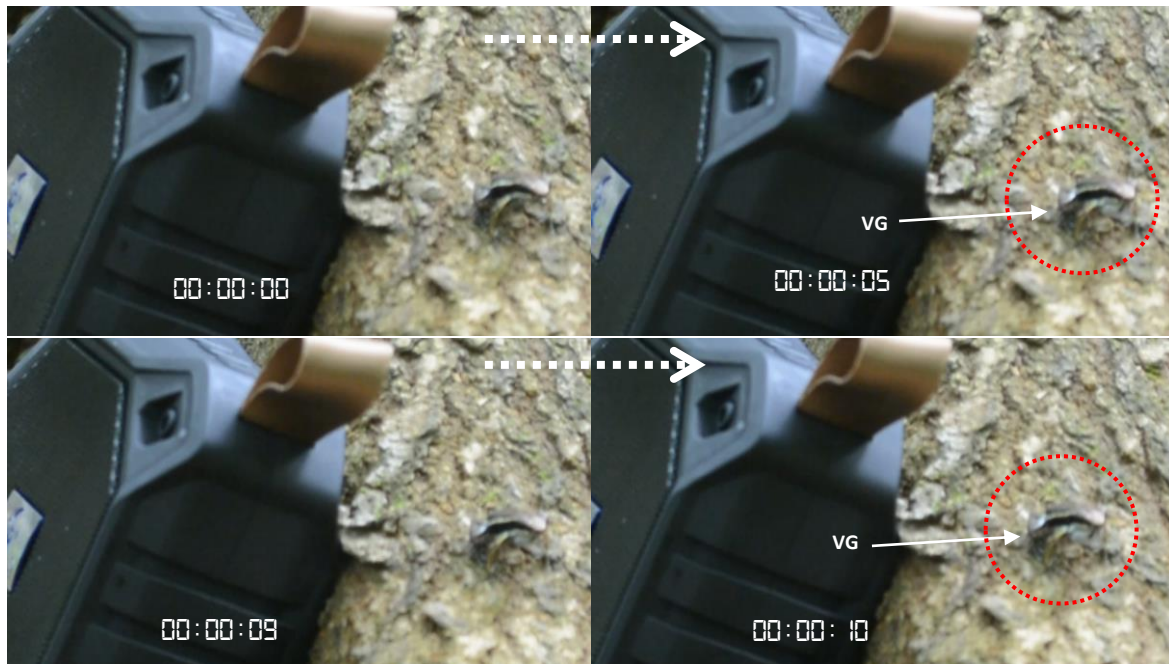


Figura 30. Macho *E. Boulengeri*. Visualización del saco vocal (VG). Se realizó hasta 4 veces seguidas. Granja Mar Agrícola. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma.
Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio



Figura 31. Macho *E. boulengeri*. Visualización del saco vocal (VG). Atraído por el llamado de *E. narinensis* 2016. Se indica la dirección del sonido desde su fuente (Icono Azul). Granja Mar Agrícola. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio)

2. Temblor de extremidades (TE) Limb shaking: Movimiento muy rápido, con temblor de arriba-abajo en una mano, comúnmente se realiza en el transcurso de la reorientación y en encuentros agonísticos, la señal se manifestó dos veces e inmediatamente después se evidenció un leve levantamiento del cuerpo (señal que se detalla más adelante), la respuesta se dio a partir del llamado de carácter interespecífico de *E. narinensis* 2016M; la señal se presentó justo al lado de la fuente de sonido, se evidenció redireccionamiento y posteriormente huida del individuo. Duración de la señal: 00:00:04ms. (Figura 32)

Link de acceso a video. <https://cutt.ly/OYgjM8>

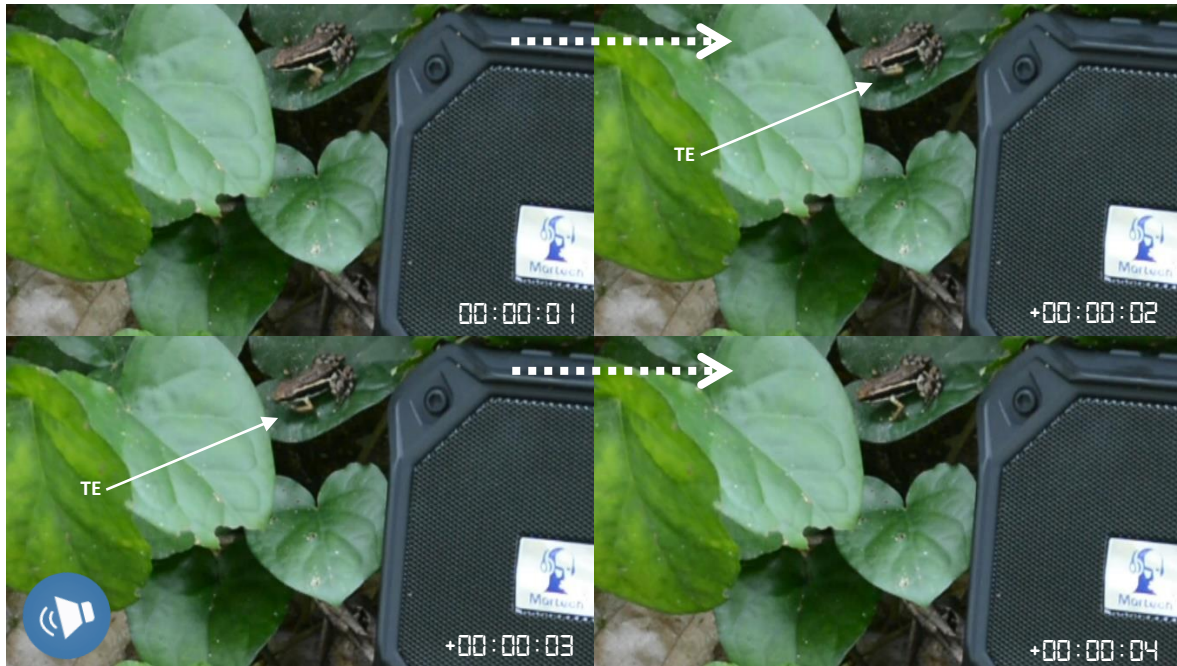
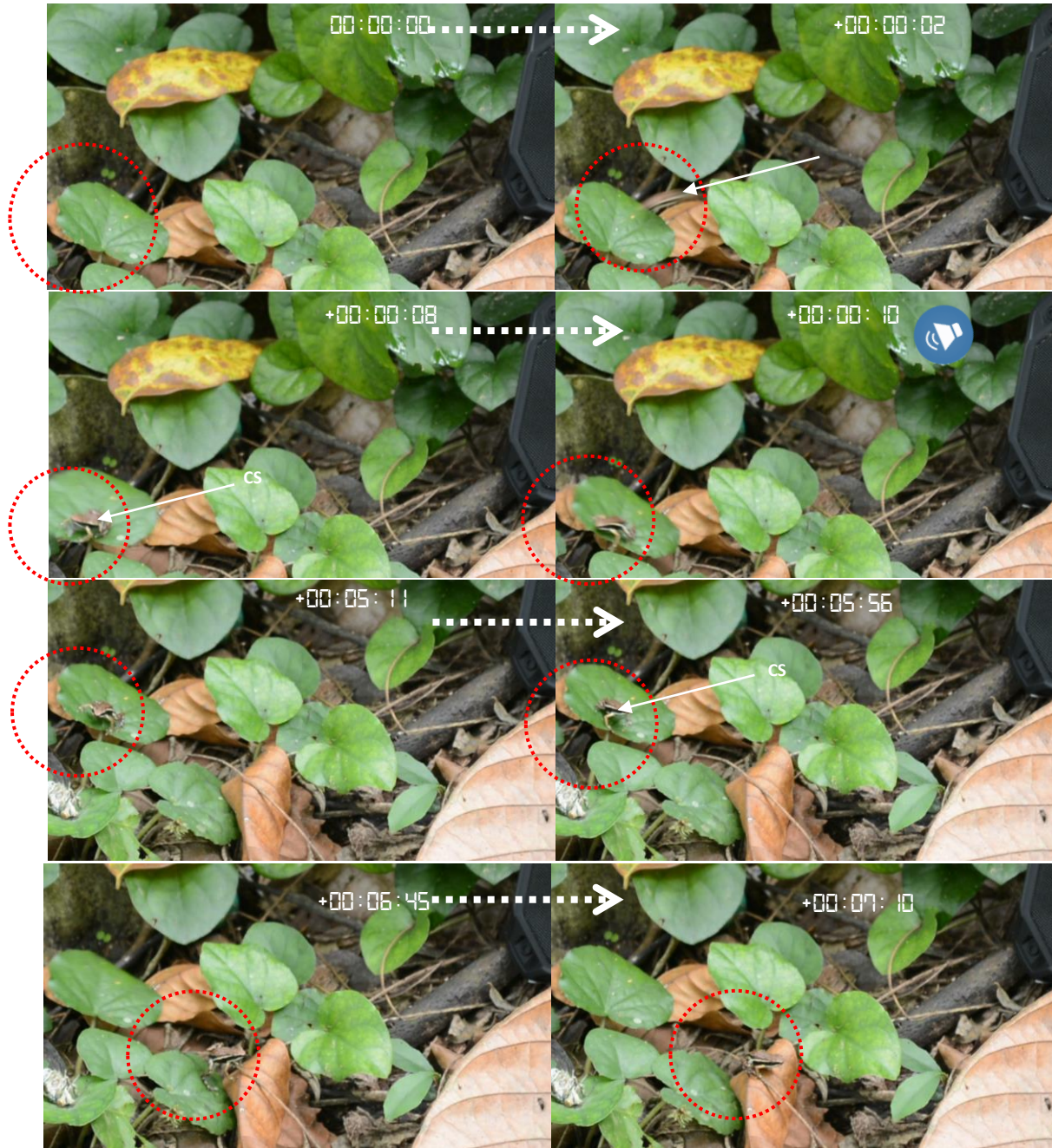


Figura 32. *E. bouleengeri*. Temblor de extremidades (TE). Atraído por el llamado de *E. narinensis* 2016. Granja Mar Agrícola. Se indica la dirección del sonido desde su fuente (Icono Azul). La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio)

3. Correr y saltar (CS) *Running-jumping display*: Correr rápidamente hacia adelante, atrás o hacia los lados, a lo largo del sustrato o reorientándose hacia la fuente de sonido, puede o no, ir acompañado de elevamiento de los pies delanteros, en algunos casos es posible observar varias señales acompañadas de esta interacción, como por ejemplo movimiento de las extremidades anteriores, correr y/o saltar, redireccionamiento o canto. (Ver videos). Algunos individuos que accedieron hasta posarse sobre la fuente de sonido fueron definidos como hembras posteriormente al sexaje llevado a cabo en el laboratorio, en algunos casos se llegaron a encontrar hasta 4 individuos recorriendo la fuente de sonido, e incluso, posándose debajo del parlante, lo que indica claramente la enorme receptividad a este tipo de llamados, las señales se evidenciaron en ambos tipos de *playback* (Intra e interespecífico). (Figuras 33, 34 y 35)



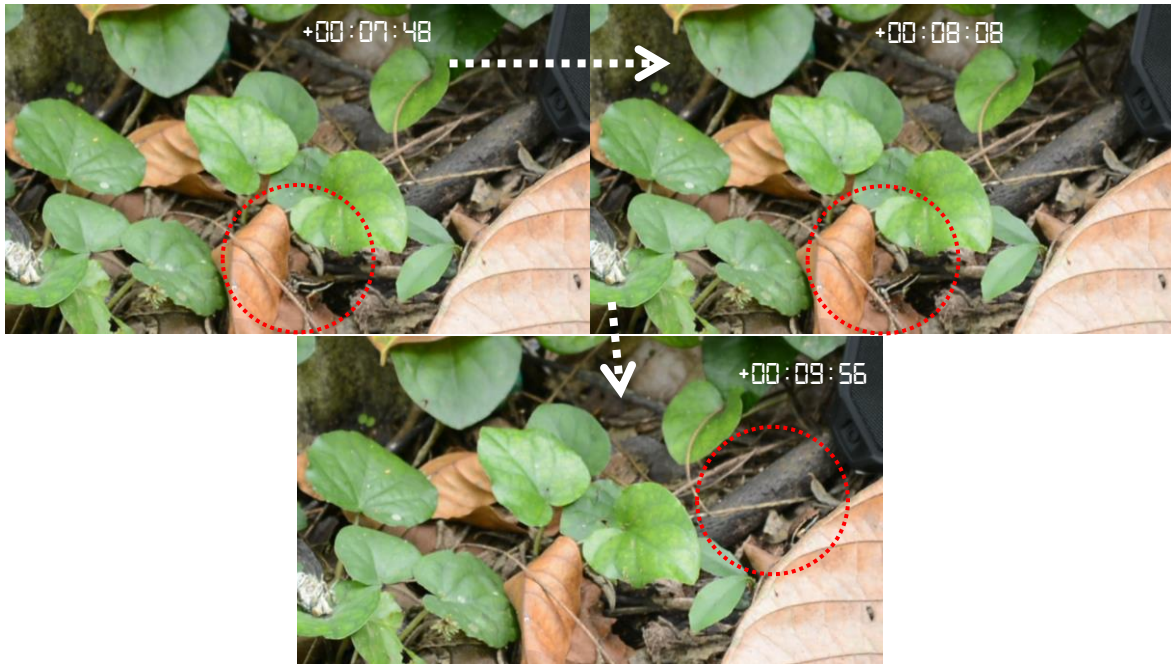


Figura 33. Macho de *E. boulengeri*. Correr y saltar (CS). Atraído por el llamado de *E. narinensis* 2016. En este caso también se observó despliegue de la gula y redireccionamiento hacia el parlante. Granja Mar Agrícola. Se indica la dirección del sonido desde su fuente (Icono Azul). Granja Mar Agrícola. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio)



Figura 34. Hembra de *E. boulengeri* en sector Mar Agrícola. Correr y saltar (CS). Atraída por el llamado de *E. narinensis* 2016, el individuo evidenció movimiento de una extremidad posterior y finalmente se ubicó debajo del parlante (Ver video), este individuo se colectó y se definió como hembra en laboratorio. Granja Mar Agrícola. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio).

Este tipo de interacción también fue evidente en la defensa de los territorios de alimentación, producto de una larga interacción con la fuente de sonido, un individuo de *E. boulengeri* realizó varios movimientos de redireccionamiento cerca de un nido de hormigas del cual se alimentaba, por lo tanto, se demuestra también la defensa de territorios propios de alimentación. (Figura 35)



Figura 35. Macho *E. boulengeri*. Correr y saltar (CS). Atraído por el llamado de *E. boulengeri*. Además del redireccionamiento se evidenció despliegue de la gula, levantamiento de extremidades y canto, en defensa de territorio de alimentación, el individuo volvió a posarse en el sitio inicial de la interacción. Granja Mar Agrícola. (Ver video). La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma.

Fotogramas de Santander, 2019, Fuente: Este estudio

Links de acceso a videos. Macho, *E. boulengeri*: <https://cutt.ly/UYgb15>; Hembra, *E. boulengeri* <https://cutt.ly/hYzwmq>; Macho *E. boulengeri*, redireccionamiento + defensa de territorio (nido de hormigas) + elaboración de canto: <https://cutt.ly/0YQ6oJ>

4. Levantamiento del cuerpo (LC) *Body raising*: Elevar el cuerpo extendiendo las cuatro patas. Se realiza generalmente en las etapas iniciales de las interacciones agonísticas y de cortejo. Se pudo evidenciar en medio de un encuentro agonístico, protagonizado por 2 individuos de *E. boulengeri*, uno de ellos transportaba 12 renacuajos en su espalda, los individuos se encontraron cuando se sintieron atraídos por el estímulo acústico correspondiente a *E. narinensis 2016M*, dicha interacción estuvo también acompañada de visualización de la gula y movimiento de las extremidades en ambos individuos, claramente las señales se evidencian a partir de la defensa de territorio y renacuajos, demostrando el cuidado parental característico en dendrobátidos. Al finalizar la interacción, el individuo que presentaba acarreo de renacuajos huyó luego de observar varios despliegues de gula y levantamiento del cuerpo por parte del otro individuo. (Ver video y figura 36)

Link de acceso a video. Encuentro agonístico de machos de *E. boulengeri*: <https://cutt.ly/GYWtdL>



Figura 36. Machos de *E. boulengeri*. Levantamiento del cuerpo (LC) + visualización de la gula (VG). Atraídos por el canto de *E. narinensis 2016M*. Encuentro agonístico. Uno de ellos con 12 renacuajos en la espalda. La interacción culminó con la huida del individuo que transportó renacuajos. Granja Mar Agrícola.

Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas ocasiones es posible evidenciar más de una señal en la misma interacción, los siguientes fotogramas muestran dicha situación.

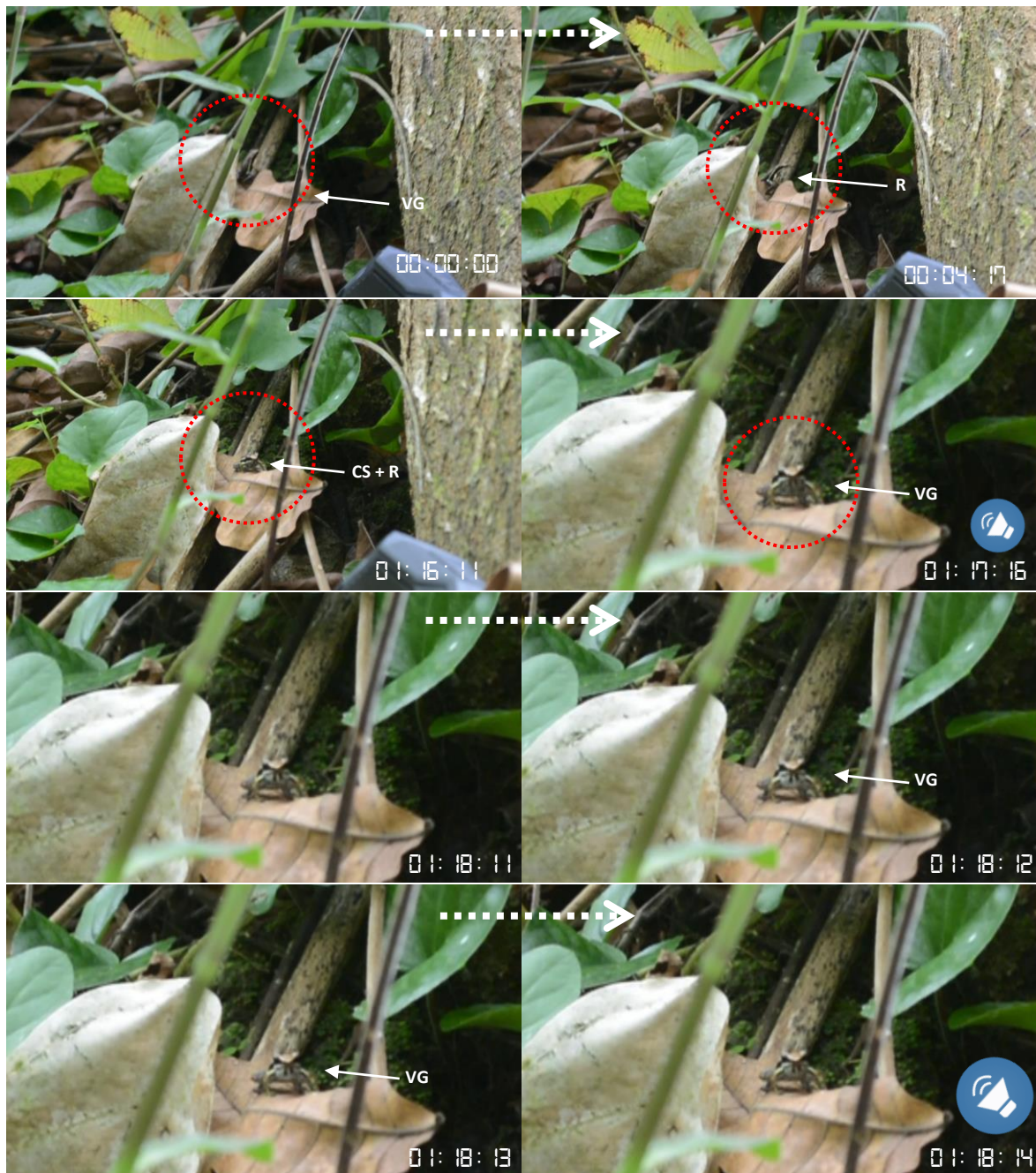


Figura 37. Macho *E. boulengeri*. Variedad de señales en una sola interacción. Redireccionamiento (R) + Correr y saltar (CS) + visualización del saco vocal (VG). Se evidenció en la misma interacción agonística de los machos ya mencionada. Granja Mar Agrícola. Se indica la dirección del sonido desde la fuente. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

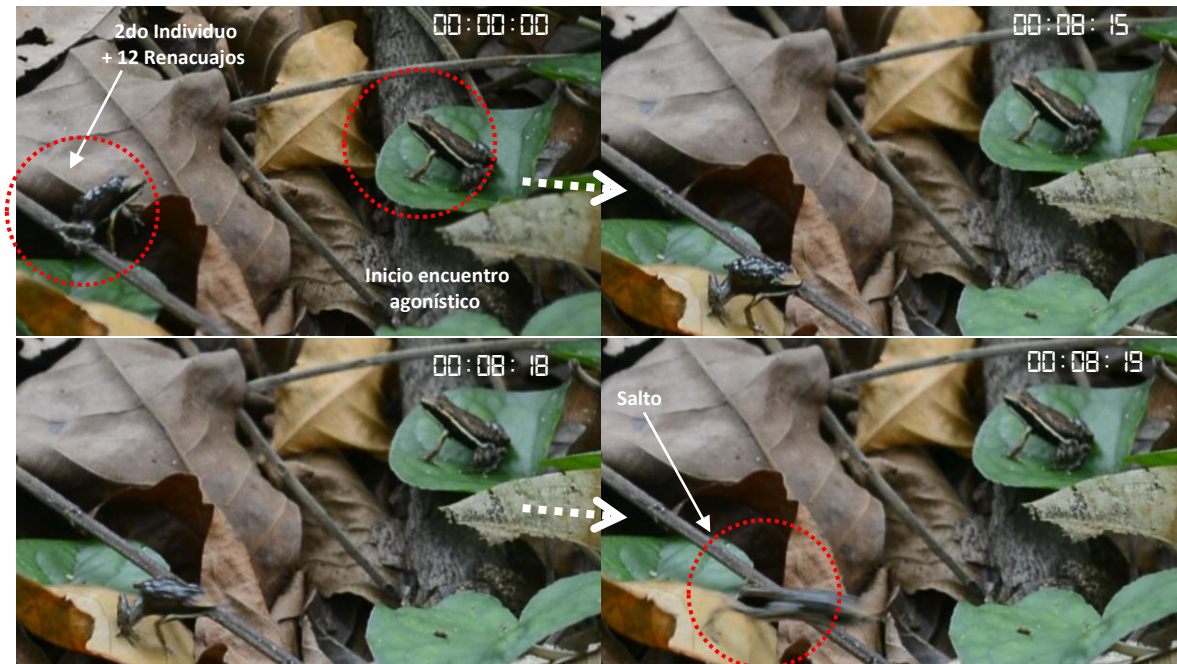


Figura 38. Machos de *E. Boulengeri*. Inicio de un encuentro agonístico, el cual demuestra la realización de varias señales entre 2 machos, uno de ellos con 12 renacuajos en la espalda, ambos individuos se posicionaron frente a la fuente de sonido y fueron atraídos por el canto de *E. narinensis 2016M*. Granja Mar Agrícola. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

Reserva Natural Biotopo

Epipedobates cf. Boulengeri (Alrededores Reserva Natural Biotopo)

A pesar de que en esta localidad se tuvieron en cuenta los mismos parámetros y cuidados al momento de aplicar las pruebas de *playback*, los resultados no fueron tan evidentes como los expuestos en el hábitat de *E. Boulengeri* y solo se pudo documentar respuestas de redireccionamiento y realización de vocalizaciones, las respuestas visuales que se muestran a continuación se dieron a partir de los mismos estímulos acústicos y solamente se pudo obtener evidencia visual a una distancia considerable (5-6 m) de algunos individuos respondiendo con cantos que se muestran también como una secuencia de fotogramas, la baja densidad poblacional y el difícil acceso a los individuos en este lugar determinaron que las respuestas no se pudieran documentar claramente. Cabe destacar que los individuos evaluados en esta localidad no se determinan como individuos de *E. narinensis* y la confirmación de su identidad, como se mencionó

en los anteriores resultados de las variables espectrales y temporales, estos individuos tienden a parecerse mucho más a *E. boulengeri* que a *E. narinensis* según los parámetros acústicos establecidos y según observaciones visuales de color, por lo tanto, se asume a partir de los resultados de la presente investigación que efectivamente dichos individuos corresponde a *E. boulengeri*, lo que confirma la condición simpátrica de las especies en mención. (Ver videos, figuras 39 y 40)

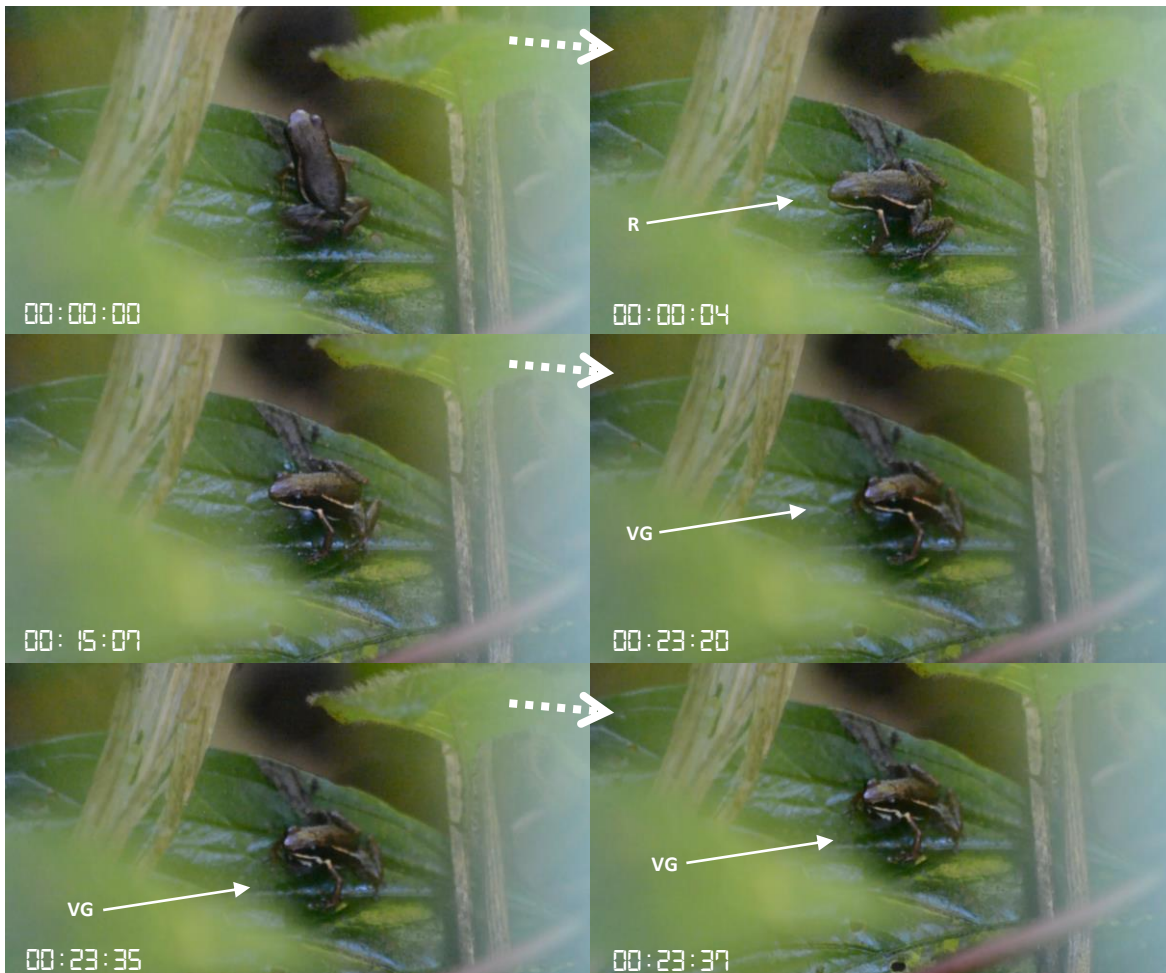


Figura 39. Macho de *E. cf. boulengeri*. Redireccionamiento hacia fuente de sonido (R) + visualización de la gula (VG). Atraídos por el canto de *E. boulengeri* y grabados a una distancia de entre 5 y 7 metros aproximadamente desde el observador. Cercanías de carretera. Reserva Natural Biotopo.
Fotogramas de Santander, 2019. Fuente: Este estudio

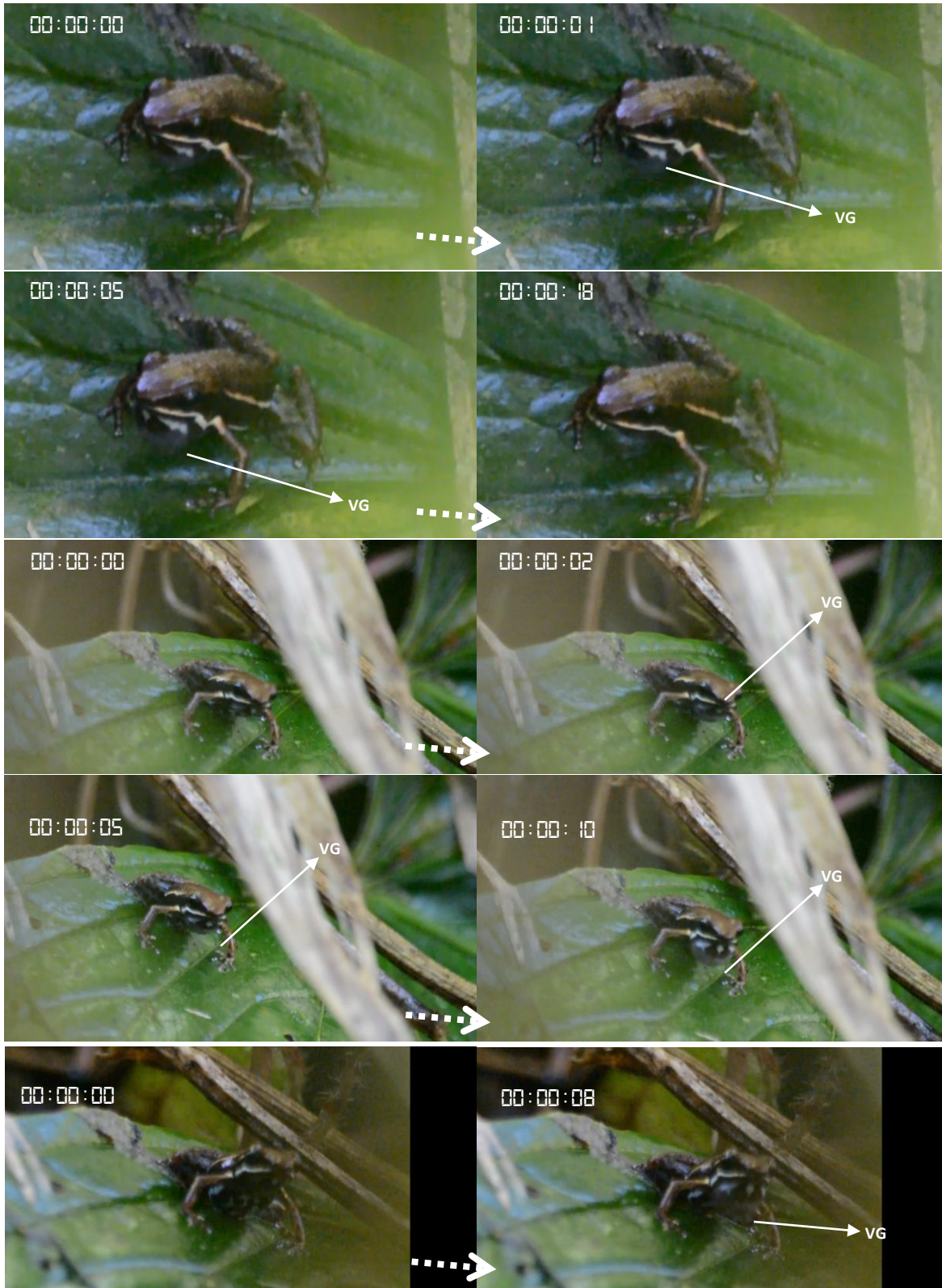


Figura 40. Macho de *E. cf. boulengeri*. Visualización de la gula (VG). Atraído por estímulo acústico de *E. narinensis* 2016M, grabado a una distancia de entre 5 y 7 metros aproximadamente desde el observador. Reserva Natural Biotopo en cercanías a la carretera. La flecha punteada blanca indica la dirección hacia el siguiente fotograma (Fotogramas de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

Links de acceso a videos. Macho 1, *E. cf boulegeri*, Redireccionamiento + Canto: <https://cutt.ly/vYWd9x>; Macho 2, *E. cf boulegeri*, Redireccionamiento + Canto: <https://cutt.ly/6YWgIN>

18. RESULTADOS ADICIONALES

Al momento de realizar las pruebas de *playback* en la Granja Mar Agrícola mes de abril de 2019, no hubo una marcada presencia de actividad acústica en los individuos, ninguno de ellos realizo llamados durante las pruebas y solamente se registraron individuos cantando esporádicamente muy lejos del sitio de muestreo al finalizar el día, como muestra el espectrograma. Dicho canto se presentó posterior a la actividad acústica de insectos de la familia Cicadidae (cigarras) las cuales presentaron una actividad acústica muy marcada durante todo el día en todos los días de muestreo, su sonido, el cual resulta muy estridente y fuerte, posee frecuencias en Hz entre 2.410,3 y 21.871,5 (alcanzando frecuencias aún más altas) con una frecuencia fundamental de 6.029,3 (muy cercana a *E. boulegeri*), dicha situación acústica, evidentemente enmascarara el canto producido por algún individuo de *E. boulegeri* en términos de frecuencia (Figura 41); la enorme población de insectos se encontró en estado de apareamiento, ninfas en desarrollo y numerosas pupas (figura 42), posiblemente dicha actividad refleje la ausencia de actividad acústica en *E. boulegeri* ya que esta situación, no se evidencio en el mes de noviembre cuando se registraron las grabaciones de los llamados para su medición y descripción. De comprobarse nuevamente esta particularidad, es posible que las poblaciones de anuros e insectos presenten actividades acústicas asincrónicas, para evitar el solapamiento.

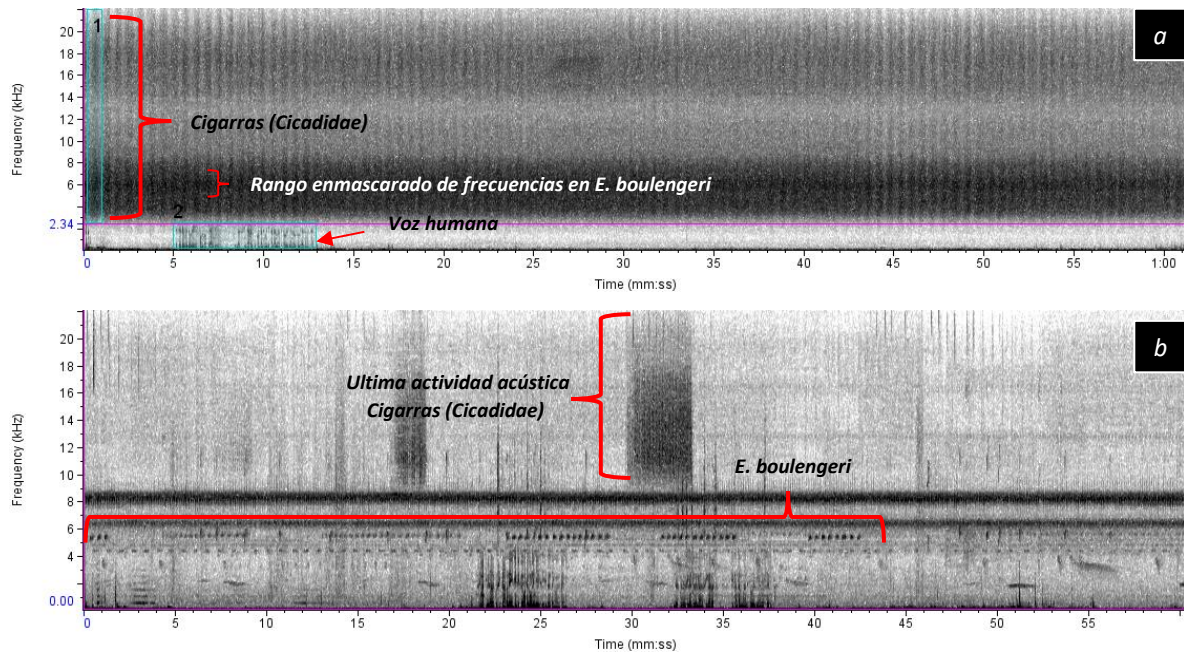


Figura 41. (A) Espectrograma de la actividad acústica de insectos (Cicadidae), se muestra su gran rango de frecuencias enmascarando el rango de *E. boulengeri* en la Granja Mar Agrícola, hora de grabación 10:40 horas de la mañana. (B) Espectrograma de una de las escasas llamadas registradas al finalizar la actividad acústica de los insectos 18:39 horas, abril de 2019. Granja Mar Agrícola; en ambas 1 minuto de grabación a 44,1 KHz; 16 Bits (Gráfico de Santander, 2019, Fuente: Este estudio).

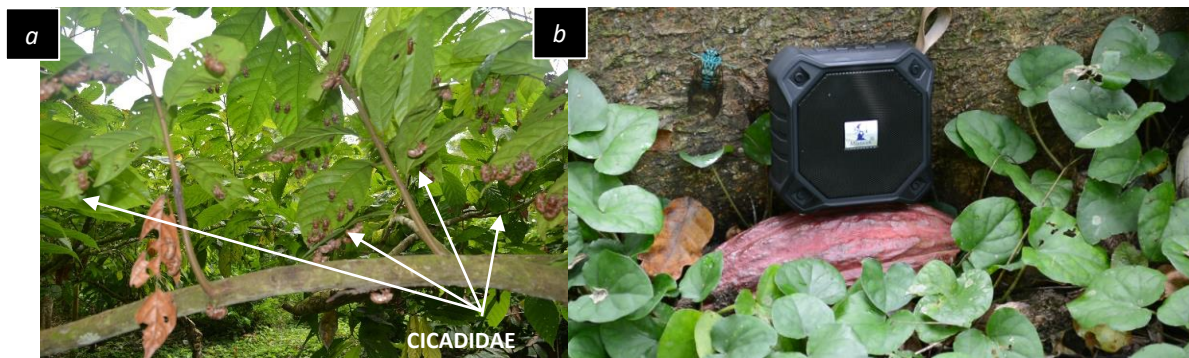


Figura 42. (A y B). Insectos de la familia Cicadidae en evidente estado de reproducción y desarrollo, coexisten con los individuos evaluados de *E. boulengeri* en el mes de abril de 2019, Granja Mar Agrícola (Fotos de Santander, 2019, Fuente: Este estudio)

19. DISCUSIÓN

Como ha sido mencionado anteriormente, las localidades de muestreo evaluadas se encuentran separadas por una distancia aproximada de 60 Km, además de esto, presentan un gradiente altitudinal considerable de (7 y 519 msnm), lo que marca algunas diferencias ambientales entre los sitios de muestreo, esto claramente influye en las variaciones espectro-temporales de los llamados de advertencia en ambas especies, ya que es bien conocido en la literatura, que en animales especialmente anuros, la temperatura ambiental afecta la velocidad de las reacciones metabólicas, debido a su naturaleza ectotérmica (P. Narins et al., 2006; Wells, 2007; Wells & Schwartz, 2006), por lo tanto, la tendencia diferencial en *E. boulengeri* con respecto a *E. narinensis* en algunos aspectos del canto, se explica a partir de las diferencias de las zonas de muestreo. Sin embargo, las especies evaluadas también evidencian una estrecha relación, la cual puede explicarse partiendo de la *hipótesis de aislamiento por distancia*, en donde las especies comparten una mayor relación filogenética, a medida que la distancia geográfica entre estas disminuye, lo cual está bien soportado mediante la confirmación de la situación simpátrica de las especies.

E. narinensis realiza llamados de advertencia con mayor número de notas, menor número de pulsos y menor duración, en comparación a *E. boulengeri*, por lo tanto, es pertinente inferir que las presiones ambientales como el clima, el hábitat o el contexto sonoro, son algunos de los factores que afectan a la producción, propagación y recepción de las señales acústicas, afianzando el papel fundamental de las presiones de selección (Wells, 2007).

Por lo tanto, es de esperarse que las especies distribuidas en vastas distancias, sin rupturas filogeográficas y con flujo genético continuo, como en *E. boulengeri*, sean bioacústicamente uniformes o que presenten diferencias bioacústicas correlacionadas con las distancias geográficas entre los individuos registrados (Slatkin, 1993). En general, la variación geográfica reportada en

las llamadas de los anuros, se relaciona con diferencias en los rasgos cuantitativos (como la frecuencia dominante, la frecuencia de las llamadas, el número de pulsos o la duración de la nota), sin embargo, no se relaciona con cambios abruptos en la estructura general de las llamadas de una determinada especie (Köhler et al., 2017), por lo tanto, las variaciones registradas en cada especies, se atribuyen a la variación geográfica de los sitios de muestreo.

19.1 Variables morfométricas

Por otro lado, es ampliamente conocido que el tamaño de los individuos se correlaciona con la frecuencia (Gingras et al., 2013; Rodríguez et al., 2015), de esa manera la variación de las frecuencias determinará que un sonido sea agudo o grave según su valor, por lo tanto altos valores de frecuencia se definen como sonidos “agudos” y bajos valores de frecuencia como sonidos “graves”, lo que se relaciona directamente con la masa de las cuerdas y la masa corporal total, por lo que las ranas más grandes producen cantos con frecuencias más bajas y las ranas más pequeñas producen cantos con frecuencias más altas, dicha estructura de frecuencias está regulada genéticamente, este patrón está fuertemente correlacionado con los rasgos espectrales del sonido y sugiere que las frecuencias fundamentales/dominantes se rigen bajo condiciones morfológicas bien establecidas (ranas más pequeñas = cuerdas vocales más cortas = llamadas a frecuencias más altas y viceversa) (Gerhardt et al., 2003; Gingras et al., 2013; Köhler et al., 2017; P. Narins et al., 2006).

De esta manera, los efectos del tamaño corporal se encuentran entre los determinantes mejor estudiados dentro de la variación de los llamados, el tamaño corporal suele correlacionarse fuertemente con las variables espectrales, correlación que se mantiene a nivel interespecífico y es casi que universal en los anuros con muy pocas excepciones (Köhler et al., 2017; Lingnau & Bastos, 2007; Rodríguez et al., 2015; Sullivan & Malmos, 1994), dicho esto en los individuos

evaluados no se encontraron diferencias significativas de tamaño, lo que automáticamente descarta la posibilidad de atribuir las diferencias en los llamados a variaciones en la morfometría.



Figura 43. (A). *E. narinensis* 2016M fotografía de Mileidy Betancourth (B). *E. cf. boulengeri* encontrada en Reserva Natural Biotopo. (C.) *E. boulengeri* de Ecuador-Reserva Rio Palenque y (D). *E. boulengeri* con acarreo de renacuajos (n=12) de Mar Agrícola-Tumaco (Fotografía de Santander 2019).

Es posible determinar que los individuos de ambas localidades son muy similares en cuanto a su morfometría, un hecho que claramente tiene implicancias en cuanto al tamaño total de los individuos, de esta manera resulta lógico inferir que debido al similar tamaño de los individuos examinados los valores de frecuencia también resulten muy similares.

19.2 Variación en los llamados de advertencia

La variación bioacústica en anuros se puede estudiar en muchos niveles, como por ejemplo entre linajes evolutivos independientes (es decir especies diferentes), con el fin de probar hipótesis de especiación, las variaciones serán mayores o menores dependiendo del nivel explorado y

requiere de una distinción correcta entre si existe variación intra o interespecífica, para sacar conclusiones taxonómicas precisas, en la mayoría de los casos la variación de las llamadas intraespecíficas en anuros se refiere a diferencias relativamente sutiles en las variables cuantitativas y no a diferencias fundamentales en la estructura de la llamada como se da en la variación interespecífica (Vences et al., 2007), por el contrario la variación interespecífica es altamente relevante para la delimitación e identificación de especies (Köhler et al., 2017). Varios estudios destacan una señal filogenética sorprendentemente alta en todos los rasgos de los llamados de los dendrobátidos, además destacan que esos rasgos, varían en la magnitud del poder filogenético (Blair, 1955; Erdtmann & Amézquita, 2009; Jones, 1997; Köhler et al., 2017; Lötters et al., 2003; P. Narins et al., 2006, 2003), lo que sugiere que las fuerzas evolutivas, han actuado de manera distinta en cada rasgo, particularmente los pulsos poseen la señal filogenética más fuerte y en este estudio dicho rasgo fue sustancialmente diferente entre ambas especies.

En cuanto a la especie *E. Boulengeri*, se han realizado algunos estudios a nivel del canto (Aguilar, 2003; Lötters et al., 2003; Pinzón, 2004), los cuales concuerdan con los resultados de la presente investigación, por ejemplo, Lötters et al., (2003) describieron cinco llamados de advertencia de solamente dos individuos, (uno de Colombia y otro de Ecuador), los cuales se diferenciaron solamente en que el primero (Individuo de Colombia) es mucho más corto en términos de número de notas y duración, a diferencia del segundo (Individuo del Ecuador), estos se denominaron como *E. cf Boulengeri* y a pesar de que el número de individuos y sus cantos no abarcan considerablemente la variación poblacional, sus resultados no difieren sustancialmente de los nuestros, aunque se tomaron variables diferentes, podemos destacar los valores del rango de frecuencia fundamental (5136 - 5260 Hz) vs (5254,1 - 5598,6 Hz en este estudio) y la similitud en los espectrogramas, esta mínima diferencia es atribuida al número de individuos evaluados

(Lotters, 10 cantos y 2 individuos vs Santander, 34 cantos y 5 individuos, en *E. boulengeri*) sin embargo, es necesario destacar que el número de pulsos, la cual fue una variable muy determinante para esta investigación, en el caso de Lotters no se tuvo en cuenta y aunque ellos atribuyeron las diferencias de los llamados a la motivación de los individuos para realizar el canto, no mencionan nada acerca del tamaño; las variables descritas por Lotters se tendrán en cuenta para los futuros estudios a realizarse dentro del género *Epipedobates* de Nariño.

En términos de variables espectrales, la frecuencia pico o fundamental, se ha correlacionado con el tamaño corporal y presenta una fuerte señal filogenética (cuando las diferencias son realmente significativas) (Gingras et al., 2013; Rodríguez et al., 2015), sin embargo, en este estudio se detectó que la frecuencia fundamental, es poco diferente entre ambas especies, debido a la similitud en tamaño de las dos especies y talvez al probable evento reciente de especiación al que se estarían enfrentando las poblaciones, dicha afirmación determinaría que los individuos evaluados probablemente se estén “recientemente” diferenciando, ya que existe un alto reconocimiento de las señales acústicas, sin embargo, también se debe tener en cuenta que la mayoría de las variaciones en los rasgos de los llamados también se pueden explicar por la historia filogenética de la especie, además de los procesos estocásticos, que también podrían explicar la divergencia evolutiva en las llamadas de los anuros (Erdtmann & Amézquita, 2009).

En la evaluación de las características bioacústicas de los cantos, las variables temporales como la duración de las llamadas o notas, la frecuencia del pulso dentro de las notas y el número de pulsos por nota parecen ser más estáticos dentro de los individuos y son menos afectados por la temperatura ambiental, lo que claramente corrobora que las diferencias de este tipo halladas en ambas especies son intrínsecas a los llamados, permitiendo así establecer la cercanía taxonómica de las especies (Köhler et al., 2017).

Finalmente, haciendo uso las variables bioacústicas con poder taxonómico y sus diferencias, es posible delimitar los individuos examinados en términos de variables espectrales (frecuencia fundamental y máxima) y en términos de variables temporales (número de pulsos, número de notas y duración), por lo tanto, se afirma que los llamados evaluados corresponden a especies diferentes con algunas características similares y aunque se ha comprobado en otras familias de anuros que las variables temporales de las llamadas se correlacionan con el gasto de energía y el ajuste que los machos pueden realizar al detectar la presencia de otros, estudios más recientes indican que las relaciones entre la actividad de llamada y el consumo de energía pueden ser mucho más complejas, enfatizando en la necesidad de realizar observaciones más completas de los rasgos relacionados con la actividad de llamadas incorporando no solo del contexto social sino también, períodos de reproducción, locomoción y estrategias al momento de vocalizar (Carvalho, Gomes, & Navas, 2008; Wells & Taigen, 1986)

19.3 Experimentos de *playback*

El comportamiento característico y agresivo de los dendrobátidos, es atribuido a la defensa de sus territorios incluyendo sus sitios de canto, sitios de alimentación y nidadas, el comportamiento es típico de los machos los cuales también se caracterizan por entrar en los denominados *conflictos agonísticos*, los cuales reflejan la competencia individual. (Castillo & Coloma, 2008; Kaplan, 2014; Smith, 1997)

E. boulengeri, reconoce indiferenciadamente el canto intraespecífico de *E. boulengeri* y *E. cf. boulengeri* 2018 y el interespecífico de *E. narinensis* 2016M, lo que evidencia que las diferencias encontradas en cada uno de los llamados resultan irrelevantes para los individuos, en términos de reconocimiento de parejas potenciales por parte de las hembras y de intrusos por parte de los machos, esto se contrasta con los resultados negativos al estímulo control de *P. unistrigatus*

en donde no hubo ningún tipo de respuesta positiva en todos los experimentos, la explicación al reconocimiento interespecífico podría atribuirse a la estrecha relación filogenética de las especies y al tipo de evolución al que probablemente están siendo enfrentadas, esta hipótesis se detalla más adelante.

19.4 Reconocimiento interespecífico

La base del reconocimiento del canto implica que las señales codifiquen una cantidad mínima de información que permita el reconocimiento de las especies debido a los altos costos que implicaría el reaccionar frente a las señales hetero-específicas como si fueran homo-específicas "falsas alarmas" (Gerhardt et al., 2003; Höbel & Gerhardt, 2003), el reconocimiento interespecífico, se produce cuando los individuos receptores comparan las señales detectadas, con las señales "plantillas" preexistentes en su sistema nervioso central. Por lo general, esto se utiliza en experimentos de reproducción de estímulos acústicos y se supone el reconocimiento de la señal cuando los individuos receptores puestos a prueba muestran respuestas de comportamiento es decir cuando "tratan como válida" la señal de estímulo (P. Narins et al., 2006).

En ranas expuestas a estímulos acústicos, se han encontrado los niveles más altos de andrógenos y son particularmente altos en individuos y especies de alta actividad acústica como los dendrobátidos, por lo tanto, el reconocimiento interespecífico del canto en *E. boulengeri*, se hace evidente gracias a un mecanismo específico de reconocimiento, el cual está mediado por hormonas, varios estudios han sugerido que las hormonas y la energía están estrechamente vinculadas entre sí de muchas maneras y todos estos factores tienen el potencial de influir en el reconocimiento de las señales (Emerson & Hess, 1996; Köhler et al., 2017; Martos et al., 2012; Solís & Penna, 1997; Ten, 2005), lo que explica con mayor claridad el reconocimiento intra e

interespecífico observado en *E. boulengeri*, infiriéndose que mediante los estímulos acústicos aplicados, se desencadenó dicho proceso fisiológico.

La territorialidad está definida como el dominio del espacio, lo que garantizara el acceso primario a los recursos por parte del defensor, a partir del reconocimiento y el acceso a los estímulos acústicos evidenciados se corrobora que el comportamiento territorial y agresivo característico en dendrobátidos, fue notoriamente influenciado por los llamados de carácter específico y conespecífico (especie muy cercana) y se ha comprobado en numerosos casos que estos individuos exhiben un comportamiento territorial en ambos sexos asociado a la defensa de territorios reproductivos y no reproductivos (agua, comida, refugio), en algunos casos el recurso limitado por el cual compiten y defienden los machos son las hembras, (Pröhl, 2005), cabe destacar que en todos los casos se identificó inequívocamente el recurso defendido, por lo tanto en esta investigación se afirma que los recursos defendidos fueron hembras, sitios de alimentación y sitios de refugio.

La defensa de esos recursos, aunque es energéticamente costosa puede ser necesaria para la supervivencia o reproducción lo que aumenta el éxito reproductivo de los individuos, la competencia en el acceso a los recursos se logra a través de interacciones sociales de comportamiento y aunque la mayoría de los territorios se defienden en contra de individuos conspecíficos, también se ha documentado que existe territorialidad interespecífica con especies similares y recursos similares en anfibios como las salamandras y se ha reportado en menor medida en algunas especies de anuros, los individuos conespecíficos y a veces interespecíficos son atacados presumiblemente porque todos compiten por los mismos recursos, lo que también explicaría el marcado reconocimiento evidenciado en *E. boulengeri*, dicha territorialidad ha sido bien comprobada en machos de los géneros (*Dendrobates*, *Phylllobates*, *Epipedobates* y

Colostethus), esto se logra evidenciar mediante estímulos con llamadas de advertencia y puede finalizarse por medio de combates físicos, en las especies *Epipedobates femoralis* y *E. trivittatus* el éxito de apareamiento se correlaciona con la actividad de los llamados y el tamaño del territorio (Hairston, 1980; Howard, 1978; Kaufmann, 1983; Kluge, 1981; Pröhl, 2005; Roithmair, 1992, 1994; Stewart & Rand, 1991; Wells, 1977).

Mediante la evidencia del reconocimiento por parte de un individuo macho con acarreo de renacuajos de *E. Boulengeri*, se comprobó que el cuidado parental masculino (cuidado de huevos y transporte de renacuajos) es una de las principales características de la familia, lo que es confirmado por varios estudios de cuidado parental en los géneros *Colostethus* *Phyllobates* *Minyobates* y *Epipedobates* en donde se ha propuesto esa condición como una característica conductual basal en los dendrobátidos (Summers et al., 1999; Weygoldt, 1987).

19.5 Playback en la Reserva Natural Biotopo

Debido a las diferencias en la densidad poblacional de los individuos con respecto a los de la Granja Mar Agrícola, las pruebas de *playback* y reconocimiento de los estímulos acústicos no tuvieron resultados positivos, con excepción de 3 pruebas de *playback* en las que se registraron respuestas acústicas, dos de estos individuos se pudieron grabar en video y sirvieron para determinar las pocas señales visuales detectadas en esta localidad las cuales corresponden a redireccionamiento hacia la fuente de sonido y la elaboración de cantos, un individuo se grabó acústicamente para determinar diferencias entre su canto y el del estímulo; de esta manera no resulta posible inferir que la especie *E. narinensis* de la reserva Natural Biotopo responde positivamente a estímulos acústicos intra e interespecíficos, por lo tanto es evidente que se deben realizar esfuerzos mayores de muestreo en esta localidad. Cabe destacar que esta zona de muestreo ha presentado por años innumerables problemas de orden público, asociados a enfrentamientos del

ejército nacional con grupos al margen de la ley quienes han ocupado dichos territorios, lo que ha dificultado y dificultó el acceso en ocasiones por varios meses, a la espera de algún tipo de solución para poder ingresar a los sitios de muestreo sin riesgos para los investigadores, los instrumentos y equipos.

Por otro lado, la motivación de respuesta en los individuos puestos a prueba es un factor comúnmente subestimado en la práctica y en la literatura actual. Dicha motivación puede variar mucho y también dependerá de los diferentes factores bióticos y abióticos, la temperatura, la precipitación, el viento la luz, la presencia de congéneres, la presencia de posibles depredadores, la etapa hormonal, la perturbación del hábitat entre factores pueden influir en la motivación (Köhler et al., 2017), algunas de estas características diferenciales, se hacen evidentes en las zonas de muestreo y podrían explicar las diferencias en cuanto al reconocimiento del estímulo acústico y la motivación. Por ejemplo, en la localidad de Tumaco hay una particularidad y es que existe una alta densidad de individuos en espacios muy reducidos dentro de plantaciones de cacao olvidadas (hábitat predilecto), lo que indica que reproductivamente se han extendido en un nicho de relativamente fácil ocupación sin presencia antropogénica, además de que existen diferencias en cuanto a las condiciones de luz, ruido biótico y abiótico, en contraste a un escenario completamente distinto como el que se evidencia en Biotopo, aquí los individuos puestos a prueba además de presentar una baja densidad poblacional, ocupan lugares cercanos a la carretera, en donde la presencia humana es muy marcada y constante, característica que podría hacer que los individuos de este sector no tengan la misma motivación al momento de reaccionar al *playback*, ya que podrían no sentirse totalmente “seguros”, por lo tanto, la determinación acústica en este sector resultó ser relativamente alta, en ese caso la determinación visual de los individuos resultó ser muy baja y sin registros positivos de acceso a la fuente de sonido.

Sin embargo, mediante el análisis de los registros acústicos fue posible determinar la posible presencia de la especie *E. boulengeri* con base en el análisis de frecuencias fundamentales, número de notas y número de pulsos. Como ha sido parte sustancial del problema de investigación planteado aquí, determinar la verdadera identidad de los individuos de esta localidad presenta muchas complicaciones basándose en la evaluación de características como el color, como se ha dicho anteriormente las diferencias existen pero son muy efímeras y difíciles de evidenciar directamente en campo, una buena herramienta taxonómica es la evaluación de variables acústicas como lo hemos venido mencionando anteriormente, de esta manera se infiere que los cantos registrados en la Reserva Biotopo y que son resultado de las pruebas de *playback* se asemejan más a las características determinadas en *E. boulengeri*, y como es evidente en los espectrogramas la variable de frecuencia fundamental varía en aproximadamente 1Kz (1000Hz). Esta diferencia, con base en nuestros resultados se determinó como la principal característica diferencial entre *E. boulengeri* y *E. narinensis*, además del número de pulsos y el número de notas que también evidencian la gran similitud con el comportamiento de las variables en *E. boulengeri*, este hecho no se ha determinado fielmente hasta el momento ya que para ello hace falta una evaluación más detallada de las características de los individuos, realizando colectas de individuos, mediciones, aumento del esfuerzo de grabación y la inclusión de un análisis molecular, de momento y basándonos en nuestros resultados las especies están en condición simpátrica algo que no se había documentado hasta el momento y que claramente nos lleva a determinar el tipo de enfoque evolutivo al que podrían estar enfrentados dichos individuos.

19.6 Ruido biótico

Por otro lado, durante toda la experimentación en la Granja Mar Agrícola aplicando estímulos acústicos en el mes de abril de 2019, no fue posible la grabación de cantos de *E. boulengeri* ya que en estos días de muestreo no se evidencio la actividad acústica de los mismos, dicha particularidad, se explica al momento de detectar muy notoriamente la enorme actividad acústica diurna por parte de innumerables insectos de la familia Cicadidae (cigarras), denominada como *ruido biótico*, dichos individuos realizaron su actividad acústica en todas las horas del día, reduciéndola solamente en horas cercanas a las 7 de la noche, momento en el cual fue posible grabar un individuo de *E. boulengeri*, como se muestra en los anteriores espectrogramas.

Este tipo de insectos, son reconocidos especialmente por la agudez de su sonido (destinado a atraer a las hembras), el cual es producido por órganos del canto especiales, que por vibración muscular producen una pulsación rápida que se escucha en días soleados. El sonido es producido por los machos, siendo uno de los ruidos más potentes del reino animal ya que su canto puede alcanzar los 120 dB y puede ser oído a 2 km de distancia (Salazar, 2005).

La actividad acústica de estos individuos, ocupa todo el rango de frecuencias en la que se ha determinado que canta *E. boulengeri* (entre los 5 y 6 KHz), ocupando un rango constante y extenso (entre los 2,34 y más de 20KHz) superando incluso el espectro audible humano (20Hz - 20KHz), esta característica en el muestreo no se evidencio en el mes de noviembre de 2018, cuando se registraron los cantos de *E. boulengeri* para su descripción, como lo evidencia el espectrograma, cualquier posible actividad acústica de los individuos anuros se enmascararía con el *ruido biótico*. De ese modo, es bien conocido que el ruido ambiental provenientes de diversas fuentes (bióticas, abióticas, sintéticas o antrópicas) afecta notablemente a la comunicación acústica de las especies animales (Gerhardt et al., 2003; Llusia, 2013), lo que sugiere que ambos taxones podrían haber

establecido algún tipo de sincronía acústica, en donde los anuros realizan sus actividades en periodos diferentes a los de los insectos.

20. AISLAMIENTO INTERESPECÍFICO Y EVOLUCIÓN DIVERGENTE

El tercer y último objetivo de investigación, se abordó con respecto al reconocimiento interespecífico, a partir del registro positivo de las respuestas interespecíficas y ante la verificada situación simpátrica de las especies, se trató de evidenciar procesos evolutivos que sean distinguibles a partir de la examinación de los resultados de estudios evolutivos llevados a cabo dentro de la familia Dendrobatidae y en otros grupos animales.

Actualmente, el género *Epipedobates* se ha considerado como el clado más joven en cuanto al origen del aposematismo en dendrobátidos (*el aposematismo se correlaciona con mayores tasas de especiación en dendrobátidos*) y se ha demostrado que su rápida radiación y su baja divergencia genética, también promueven casos de aislamiento periférico, en donde se desarrollan procesos de divergencia fenotípica, (Graham et al., 2008; Köhler et al., 2017; Littlejohn, 1970; Santos et al., 2009; Tarvin et al., 2017).

Los estudios comparativos basados en divergencia poblacional ofrecen un enfoque poderoso para comprender las condiciones que facilitan o restringen la especiación ecológica en donde la selección divergente entre poblaciones que habitan diferentes condiciones ecológicas generara aislamiento reproductivo. (Amézquita et al., 2011; Edwards et al., 2005; Hatfield & Schluter, 1999; Jiggins, Naisbit, Coe, & Mallet, 2001; Jones, 1997; Rosenblum, 2006; Twomey et al., 2014) dichas condiciones ecológicas diferentes a las que se enfrentan los individuos pueden ser, el tipo de suelo (hojarasca, arena, hierba etc.), gradientes de condiciones de luz, gradientes de ruido, que generalmente son influenciados por eventos históricos (cambio climático, deriva génica,

etc.), por lo tanto, los factores ambientales también pueden tener una influencia considerable (Cocroft & Ryan, 1995; Goutte, Dubois, & Legendre, 2013; Köhler et al., 2017; Vargas & Amézquita, 2013, 2014). Es de resaltar, que *E. cf. boulengeri* de la localidad de Biotopo se encontró en mayor densidad en cercanías a la carretera principal en donde las condiciones de luz o de ruido son sustancialmente diferentes a las condiciones que enfrenta *E. narinensis* en la misma localidad de Biotopo, que según la descripción original de la especie habita zonas más internas la reserva. Por lo tanto, un buen enfoque consiste en estudiar pares de especies que se han divergido en un entorno ecológico común, revelando las propiedades inherentes de las especies que facilitan o restrinjan la especiación ecológica y esto se ha demostrado recientemente en ranas como *Ranitomeya imitator* (Dendrobatidae), en peces y en lagartijas (Berner, Grandchamp, & Hendry, 2009; Jiggins, Estrada, & Rodrigues, 2004; Jiggins et al., 2001; Rosenblum, 2006; Twomey et al., 2014).

Debido a que se comprobó, que las especies bajo investigación se encuentran en condiciones simpátricas en la zona de la Reserva Natural Biotopo, podríamos determinar, que dicha localidad haría parte de las denominadas *zonas de transición* (o zonas híbridas), las cuales han sido muy importantes para la investigación de la especiación, ya que a menudo reflejan un equilibrio entre los efectos diversificantes de la adaptación local y los efectos homogeneizadores del flujo de genes y la migración, teóricamente en estas zonas los individuos aún pueden intercambiar genes, y es posible que brinden información sobre las barreras reproductivas al inicio de los procesos de especiación (Barton & Hewitt, 1985; Twomey et al., 2014); dicho esto, en teoría las especies *E. boulengeri* y *E. narinensis* podrían haber enfrentado presiones selectivas distintas en la localidad de Biotopo (gradiente de disponibilidad de luz, gradiente sonoro) forzando a los individuos a diferenciarse bioacústica (temporal-espectral) y fenotípicamente (color), llevando a

los individuos a un escenario de evolución divergente temprano, ya que a pesar de las diferencias encontradas hasta el momento los individuos aún se reconocen acústicamente.

En la rana venenosa dendrobática *Ranitomeya imitator*, este tipo de evolución ha sido bien documentado, se conoce que la especie ha experimentado una muy rápida diversificación en el patrón de coloración, estableciendo así cuatro morfotipos distintos en 3 zonas de transición del norte central del Perú, la especie en mención ha sido estudiada bajo parámetros muy bien establecidos, como el grado de divergencia genética, divergencia comportamental, cuantificación del color y experimentos de elección de pareja, en donde se determina que los morfotipos están fuertemente diferenciados fenotípicamente, produciendo clines (cambio gradual de rasgos fenotípicos), sin embargo, los distintos morfotipos muestran poca divergencia genética y se ha detectado, que el aislamiento por distancia es el principal determinante de la diferenciación genética entre esas poblaciones, así se demuestra también, que en las zonas de transición puede haber intercambio de genes; teniendo en cuenta que nuestros resultados demostraron que existe un evidente reconocimiento interespecífico del canto, es posible teorizar que las especies de *Epipedobates*, aun no terminan de aislarse reproductivamente, lo que se manifiesta en la similitud de las frecuencias y en el acceso al llamado interespecífico, que en contraste con las notorias diferencias en las variables temporales, reflejarían un proceso temprano de especiación simpátrica, en donde no existen barreras geográficas entre las poblaciones, más sin embargo, la variación en algún tipo de gradiente ambiental, puede conducir al aislamiento reproductivo y por ende a la especiación.

21. CONCLUSIONES.

1. Los cantos de las especies *E. boulengeri* y *E. narinensis*, presentan características muy similares en términos de variables espectrales, sin embargo, es posible determinar varias diferencias en términos de variables temporales como la duración, número de notas y número de pulsos, lo que mantiene y afianza el estatus de especies diferentes.

2. Mediante las pruebas de *playback* se evidenciaron respuestas interespecíficas, que se atribuyen a la similitud de las características de los llamados y a la defensa de los recursos y fueron mucho más evidentes en la localidad de Mar Agrícola, debido a la alta densidad poblacional de la zona, dichas respuestas afianzan la cercanía de las especies.

3. Mediante el uso de la bioacústica, se determinó que los individuos previamente denominados como *E. cf. boulengeri*, que ocupan los territorios más intervenidos de la zona de Biotopo, corresponden acústicamente a individuos de *E. boulengeri*, demostrando la simpatria en *E. boulengeri* y *E. narinensis* (el de la Localidad tipo) y un posible caso reciente de evolución divergente, de ese modo rechazamos la hipótesis de aislamiento alopátrico y aceptamos la hipótesis de aislamiento simpátrico.

4. Las variables morfométricas no demuestran una diferencia significativa entre las poblaciones examinadas a partir de los datos de museo, por lo tanto, las pequeñas variaciones de frecuencia no pueden ser atribuidas a ninguna variación morfológica.

22. RECOMENDACIONES

1. Recomendamos ampliar el análisis acústico, con la realización de más grabaciones y el aumento de variables tanto espectrales como temporales, con el fin de evidenciar otras diferencias o similitudes entre las especies.

2. Se recomienda, realizar pruebas de *playback* en las que se incluyan llamados de advertencia de todas las especies del género, para dilucidar hasta qué punto puede llegar el reconocimiento interespecífico.

3. Es recomendable, ampliar las zonas de muestreo incluyendo lugares en los que recientemente se ha determinado la presencia de *E. boulengeri*, como la Reserva Natural Río Ñambi y el lugar donde se describió la especie en la Isla Gorgona, así se podrían establecer diferencias en los llamados a través de un gradiente altitudinal.

4. Para hacer una relación de la temperatura corporal y los llamados evaluados, se recomienda realizar grabaciones que estén acompañadas de la medida de temperatura individual, además de la temperatura ambiental.

5. Se recomienda, la colecta de individuos en la zona de Biotopo (carretera e interior de la reserva) ya que es primordial un estudio a nivel molecular entre *E. narinensis* y *E. boulengeri*, lo que ayudaría a dilucidar de mejor manera la estrecha relación de los individuos.

LITERATURA CITADA

- Acosta, A. (2019). Lista de los Anfibios de Colombia. Recuperado de <http://www.batrachia.com>
- Aguilar, D. (2003). *La teoría del filtro ajustado en frecuencia se cumple en la respuesta fonotáctica de Epipedobates boulengeri*. Biología Universidad de los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Ciencias Biológicas.
- Amézquita, A., Castellanos, L., & Hödl, W. (2005). Auditory matching of male Epipedobates femoralis (Anura: Dendrobatidae) under field conditions. *Animal Behaviour*, 70(6), 1377–1386. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.03.012>
- Amézquita, A., Flechas, S., Lima, A., Gasser, H., & Hodl, W. (2011). Acoustic interference and recognition space within a complex assemblage of dendrobatid frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17058–17063. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104773108>
- Amézquita, A., Hodl, W., Lima, A., Castellanos, L., Erdtmann, L., & de Araujo, M. (2006). Masking interference and the evolution of the acoustic communication system in the Amazonian dendrobatid frog Allobates femoralis. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 60(9), 1874–1887.
- Andrade, G., Gómez, R., & Ruíz, J. (1992). *Biodiversidad, conservación y uso de recursos naturales: Colombia en el contexto internacional*. FESCOL.
- Anganoy, M. (2014). *Exploración y análisis de caracteres filogenéticos en el condrocáneo de los renacuajos de los géneros de las ranas venenosas neotropicales (Anura: Dendrobatoidea)*.
- Anganoy, M., & Cepeda, B. (2017). Redescription of the tadpoles of Epipedobates narinensis and E. boulengeri (Anura: Dendrobatidae). *Phyllomedusa*, 16(2), 155–182. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v16i2p155-182>
- Angulo, A., Rueda, J., Rodríguez, J., & La Marca, E. (2006). Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. En A. Ariadne, J. V. Rueda-Almonacid, J. V. Rodríguez-Mahecha, & E. La Marca (Eds.), *Historia*. Conservación Internacional, Serie manuales para la conservación.
- Baquero, M. (2012). *Relación entre el canto de anuncio y variables ecológicas y ambientales de especies del clado Epipedobates (Anura: Dendrobatidae)*. Universidad San Francisco de Quito.
- Barton, N., & Hewitt, G. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1), 113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>
- Bernal, M., Montealegre, D., & Páez, C. (2004). Estudio de la vocalización de trece especies de anuros del municipio de Ibagué, Colombia. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 28(108), 385–390.
- Berner, D., Grandchamp, A., & Hendry, A. (2009). Variable progress toward ecological speciation in parapatry: Stickleback across eight lake-stream transitions. *Evolution*, 63(7), 1740–1753. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00665.x>
- Biavati, G., Wiederhecker, H., & Colli, G. (2004). Diet of Epipedobates flavopictus (Anura: Dendrobatidae) in a Neotropical Savanna. *Journal of Herpetology*, 38(4), 510–518. <https://doi.org/10.1670/30-04a>
- Blair, F. (1955). Mating Call and Stage of Speciation in the Microhyla olivacea-M. carolinensis Complex. *Evolution*, 9(4), 469. <https://doi.org/10.2307/2405481>
- Blaustein, A., & Wake, D. (1990). Declining Amphibian Populations: A Global Phenomenon. *Tree*, 5(7), 4–5.

- Bradbury, J., & Vehrencamp, S. (2011). *Principles of animal communication*. Recuperado de <https://global.oup.com/academic/product/principles-of-animal-communication-9780878930456#.XQb8A19LO00.mendeley>
- Brown, J., Twomey, E., Amézquita, A., De Souza, M., Caldwell, J., Lötters, S., ... Summers, K. (2011). A taxonomic revision of the Neotropical poison frog genus *Ranitomeya* (Amphibia: Dendrobatidae). *Zootaxa*, 3083(1), 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3083.1.1>
- Caldwell, J. (1996). The evolution of myrmecophagy and its correlates in poison frogs (Family Dendrobatidae). *Journal of Zoology*, 240(1), 75–101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1996.tb05487.x>
- Carvalho, J., Gomes, F., & Navas, C. (2008). *Energy substrate utilization during nightly vocal activity in three species of Scinax (Anura/Hylidae)*. 178(4), 447–456. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0236-6>
- Castillo, P., & Coloma, L. (2008). Notes on behaviour and reproduction in captive *Allobates kingsburyi* (Anura: Dendrobatidae), with comments on evolution of reproductive amplexus. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 58–70. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00039.x>
- Cisneros, D., & Yáñez, M. (2010). A new poison frog of the genus *Epipedobates* (Dendrobatoidea: Dendrobatidae) from the north-western Andes of Ecuador. *Av. Ciencias Ing*, 2(3), 1–4. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18272/aci.v2i3.49>
- CITES. (2007). *Guía de identificación de CITES - Anfibios*. Secretaría de la CITES, Ginebra, Suiza.
- Clough, M., & Summers, K. (2000). Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70(3), 515–540. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb01236.x>
- Cocroft, R., & Ryan, M. (1995). Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*, 49(2), 283–303. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0043>
- Coloma, L., Ortiz, D., Frenkel, C., & Pazmiño, G. (2017). *Anfibios del Ecuador*. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Epipedobates_boulengeri
- Correa, J., & Gonzalez, N. (2002). *Gráficos Estadísticos con R (Universidad Nacional-Sede Medellín)*. <https://doi.org/10.1109/mis.2017.2421500>
- Cummings, M., & Crothers, L. (2013). Interacting selection diversifies warning signals in a polytypic frog: An examination with the strawberry poison frog. *Evolutionary Ecology*, 27(4), 693–710. <https://doi.org/10.1007/s10682-013-9648-9>
- Darst, C., Menéndez, P., Coloma, L., & Cannatella, D. (2005). Evolution of Dietary Specialization and Chemical Defense in Poison Frogs (Dendrobatidae): A Comparative Analysis. *The American Naturalist*, 165(1), 56. <https://doi.org/10.2307/3473197>
- De Jongh, H., & Gans, C. (1969). On the mechanism of respiration in the bullfrog, *Rana catesbeiana*: A reassessment. *Journal of Morphology*, 127(3), 259–289. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051270302>
- Donnelly, M. (1989). Demographic Effects of Reproductive Resource Supplementation in a Territorial Frog, *Dendrobates Pumilio*. *Ecological Monographs*, 59(3), 207–221. <https://doi.org/10.2307/1942599>
- Edwards, S., Kingan, S., Calkins, J., Balakrishnan, C., Jennings, B., Swanson, W., & Sorenson, M.

- (2005). *Speciation in birds : Genes , geography , and sexual selection*.
- Emerson, S., & Hess, D. (1996). The role of androgens in opportunistic breeding, tropical frogs. *General and Comparative Endocrinology*, 103(2), 220–230. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0113>
- Erdtmann, L., & Amézquita, A. (2009). Differential evolution of advertisement call traits in dart-poison frogs (anura: Dendrobatidae). *Ethology*, 115(9), 801–811. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01673.x>
- Eyman, J., Degreef, J., Häuser, C., Monje, J. C., Samyn, Y., & Vanden-Spiege, D. (2010). Manual on field recording techniques and protocols for All Taxa Biodiversity Inventories and Monitoring. En *Abc Taxa – Vol 8*. (Vol. 8).
- Fenton, B. (2003). Eavesdropping on the echolocation and social calls of bats. *Mammal Review*, 33(3-4), 193–204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2003.00019.x>
- Frost, D. R. (2019). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (2019). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Furtado, R. (2017). Behavioural responses of *Boana lundii* (Anura: Hylidae) to visual and acoustic aggressive stimuli. *Herpetology Notes*, 10(November), 659–664.
- Fuzessery, Z. (1988). Acoustic properties used in call recognition by frogs and toads. En *The Evolution of the Amphibian Auditory System*.
- Gerhardt, C. (1975). Sound Pressure Levels and Radiation Patterns of the Vocalizations of Some North American Frogs and Toads. *J. comp. Physiol.*, 12. <https://doi.org/10.1007/BF00657481>
- Gerhardt, C., Dyson, M., Tanner, S., & Murphy, C. (1994). Female treefrogs do not avoid heterospecific calls as they approach conspecific calls: implications for mechanisms of mate choice. *Animal Behaviour*, 47(6), 1323–1332. <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1180>
- Gerhardt, C., Huber, F., & Simmons, A. (2003). Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 114(2), 559–559. <https://doi.org/10.1121/1.1591773>
- Gingras, B., Boeckle, M., Herbst, C., & Fitch, T. (2013). Call acoustics reflect body size across four clades of anurans. *Journal of Zoology*, 289(2), 143–150. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2012.00973.x>
- Goutte, S., Dubois, A., & Legendre, F. (2013). The Importance of Ambient Sound Level to Characterise Anuran Habitat. *PLoS ONE*, 8(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078020>
- Graham, C., Ron, S., Santos, J., Schneider, C., & Moritz, C. (2004). Integrating Phylogenetics and Environmental Niche Models to Explore Speciation Mechanisms in Dendrobatid Frogs. *Society*, 58(8), 1781–1793.
- Graham, C., Ron, S., Santos, J., Schneider, C., & Moritz, C. (2008). Integrating Phylogenetics and Environmental Niche Models to Explore Speciation Mechanisms in Dendrobatid Frogs. *Society*, 58(8), 1781–1793.
- Grant, T., Frost, D. R., Caldwell, J., Gagliardo, R., Haddad, C., Kok, P., ... Wheeler, W. (2006). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura, Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 246(299), 262. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5531/sd.sp.14>

- Grant, T., Rada, M., Anganoy, M., Batista, A., Dias, P., Jeckel, A., ... Rueda, J. (2017). Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives Revisited (Anura: Dendrobatoidea). *South American Journal of Herpetology*, 12(s1), S1–S90. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00017.1>
- Grant, T., & Rodriguez, L. (2003). Two New Species of Frogs of the Genus *Colostethus* (Dendrobatidae) from Peru and a Redescription of *C. trilineatus* (Boulenger, 1883). *American Museum Novitates*, 3355(3355), 1–24. [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2001\)355<0001:tnsofo>2.0.co;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2001)355<0001:tnsofo>2.0.co;2)
- Hairston, N. (1980). Evolution under interespecific competition: Field experiments on terrestrial salamanders. *Evolution*, 34(3), 409–420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1980.tb04829.x>
- Hammer, H., & Ryan, P. (2001). *PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. (Vol. 1). Vol. 1. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp.
- Hartmann, M., Giasson, L., Hartmann, P., & Haddad, C. (2005). Visual communication in Brazilian species of anurans from the Atlantic forest. *Journal of Natural History*, 39(19), 1675–1685. <https://doi.org/10.1080/00222930400008744>
- Hatfield, T., & Schluter, D. (1999). Ecological Speciation in Sticklebacks: Environment-Dependent Hybrid Fitness. *Evolution*, 53(3), 866. <https://doi.org/10.2307/2640726>
- Höbel, G., & Gerhardt, C. (2003). *Reproductive Character Displacement in the Acoustic Communication System of Green Tree (Hyla Cinerea)*. 57(4), 894–904.
- Hodl, W. (1987). *Dendrobates femoralis* (Dendrobatidae): a handy fellow for frog bioacoustics. En *Proceedings of the 4th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica*.
- Hodl, W., & Amézquita, A. (2001). Visual signaling in anuran amphibians. En *Anuran Communication* (pp. 121–141). Smithsonian Inst. Press. Washington, Editors: Ryan M., pp.121-141.
- Hoffmann, M. (2008). *Threatened Amphibians of the World* (I. and C. I. Lynx Edicions, Ed.). Lynx Edicions, IUCN and Conservation International.
- Holdridge, L. (1987). Ecología basada en zonas de vida. En *Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas in San Jose, Costa Rica*.
- Howard, R. (1978). The Influence of Male-Defended Oviposition Sites on Early Embryo Mortality in Bullfrogs Published by : Ecological Society of America Linked references are available on JSTOR for this article : *Ecological Society of America*, 59(4), 789–798.
- Jiggins, C., Estrada, C., & Rodrigues, A. (2004). Mimicry and the evolution of premating isolation in *Heliconlus melpomene* Linnaeus. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 680–691. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00675.x>
- Jiggins, C., Naisbit, R., Coe, R., & Mallet, J. (2001). Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*, 411(6835), 302–305. <https://doi.org/10.1038/35077075>
- Jones, G. (1997). Acoustic Signals and Speciation: The Roles of Natural and Sexual Selection in the Evolution of Cryptic Species. *Advances in the Study of Behavior*, 26(C), 317–354. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60383-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60383-6)
- Jungfer, K. (2017). On warszewicz's trail: The identity of *Hyla molitor* O. SCHMIDT, 1857. *Salamandra*, 53(1), 18–24.
- Kaplan, G. (2014). Animal communication. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 5(6), 661–677. <https://doi.org/10.1002/wcs.1321>

- Kaufmann, J. (1983). On the definitions and functions of dominance and territoriality. *Biological Reviews*, 58(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1983.tb00379.x>
- Kluge, A. (1981). The life history, social organization, and parental behavior of *Hyla rosenbergi* Boulenger, a nest-building gladiator frog. *Publications of the Museum of Zoology of the University of Michigan*, 160(160), 1–170.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P., Toledo, L., Emmrich, M., ... Vences, M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. En *Zootaxa* (Vol. 4251). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>
- Lingnau, R., & Bastos, R. (2007). (Anura: Hylodidae): Repertoire and influence of air temperature on advertisement call variation. *Journal of Natural History*, 41(780555166), 1227–1235. <https://doi.org/10.1080/00222930701395626>
- Littlejohn, M. (1970). The systematic significance of isolating mechanisms. En *Ecology* (Vol. 51). <https://doi.org/10.2307/1933648>
- Llusia, D. (2013). Comunicación Acústica en Anuros Ibéricos. Influencia del clima, hábitat y el ambiente sonoro.
- López, E., & Hidalgo, R. (2010). Escalamiento Multidimensional No Métrico. Un ejemplo con R empleando el algoritmo SMACOF. *Estudios sobre educación Vol. 18*, 18, 9–35. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100404-3.00005-6>
- Lötters, S., Jungfer, K., Henkel, F., & Schmidt, W. (2007). *Poison Frogs. Biology, Species and Captive Husbandry*. (111), 668.
- Lötters, S., Reichle, S., & 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(15), 1899–1911. <https://doi.org/10.1080/00222930110089157>
- Martínez, J., Gonzalez, J., Pilkey, O., & Neal, W. (1995). Tropical Barrier Islands of Colombia's Pacific Coast. *Journal of Coastal Research*, 11(2), 432–453. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/4298350>
- Martos, J., Román, J., Skrzynska, A., Gozdowska, M., Heras, V., Calderón, J., ... Mancera, J. (2012). *El papel de los neuropéptidos arginina vasotocina e isotocina en la regulación endocrina de procesos fisiológicos en la dorada (Sparus aurata)*. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10261/52463>
- Medina, R. (2013). Análisis acústico, genético y morfométrico en ranas venenosas andinas (Anura: Andinobates) de Colombia.
- Merrill, R., Chia, A., & Nadeau, N. (2014). Divergent warning patterns contribute to assortative mating between incipient *Heliconius* species. *Ecology and Evolution*, 4(7), 911–917. <https://doi.org/10.1002/ece3.996>
- Mueses, J., Cepeda, B., & Moreno, V. (2008). Una nueva especie de *Epipedobates* (Anura: Dendrobatidae) del suroccidente de Colombia. *Papeis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 48(1). <https://doi.org/10.1590/s0031-10492008000100001>
- Myers, C. (1982). Spotted poison frogs : descriptions of three new *Dendrobates* from western Amazonia and resurrection of a lost species from “Chiriqui”. *American Museum Novitates*, 2721(2721), 1–23.
- Myers, C. (1987). New generic names for some neotropical poison frogs (dendrobatidae). *Papeis avulsos*

de zoologia, 36(25), 301–306.

- Myers, C., & Daly, J. (1976). Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolutionary studies of poison-dart frogs (Dendrobatidae). *New York*, 157. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2246/622>
- Narins, P., Feng, A., Fay, R., & Popper, A. (2006). *Hearing and Sound Communication in Amphibians* (Springer H; P. M. Narins, A. S. Feng, R. R. Fay, & A. N. Popper, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-47796-1>
- Narins, P., Hodl, W., & Grabul, D. (2003). Bimodal signal requisite for agonistic behavior in a dart-poison frog, *Epipedobates femoralis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 577–580. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237165100>
- Padilla, D. (2014). Spatial Distribution of the Species of the Genus *Buenoa* (Hemiptera: Notonectidae) in Tumaco (Nariño, Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 19(1), 84. <https://doi.org/10.15446/abc.v19n1.38641>
- Panhuis, T., Butlin, R., Zuk, M., & Tregenza, T. (2001). Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 364–371. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02160-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02160-7)
- Pardo, C., & Ortiz, J. (2014). *Análisis multivariado de datos en R*. (May).
- Passmore, N., & Telford, S. (2001). The Effect of Chorus Organization on Mate Localization in the Painted Reed Frog (*Hyperolius marmoratus*). *Behav Ecol Sociobiol* 9:291–293., (1981), 291–293.
- Pašukonis, A., Beck, K., Fischer, M., Weinlein, S., Stückler, S., & Ringler, E. (2017). Induced parental care in a poison frog: a tadpole cross-fostering experiment. *The Journal of Experimental Biology*, 220(21), 3949–3954. <https://doi.org/10.1242/jeb.165126>
- Perez, P., Chavez, G., Twomey, E., & Brown, J. (2018). Two new species of *Ranitomeya* (Anura: Dendrobatidae) from eastern Amazonian Peru. *Zootaxa*, 2439(1), 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2439.1.1>
- Pinzón, M. (2004). *Relación entre Comportamiento Territorial y Densidad Poblacional de la Rana *Epipedobates boulengeri* (Anura: Dendrobatidae) en el Parque Nacional Natural Gorgona*. UNIVERSIDAD DE LOS ANDES Departamento de Ciencias Biológicas Bogotá D.C 2004.
- Podos, J. (2001). Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature*, 409(6817), 185. <https://doi.org/10.1038/35051570>
- Preininger, D., Stiegler, M., Gururaja, K., Vijayakumar, S., Torsekar, V., Sztatecsny, M., & Hödl, W. (2013). Getting a kick out of it: Multimodal signalling during male-male encounters in the foot-flagging frog *micrixalus* aff. *saxicola* from the Western Ghats of India. *Current Science*, 105(12), 1735–1739.
- Pröhl, H. (2005). Territorial Behavior in Dendrobatid Frogs. *Journal of Herpetology*, 39(3), 354–365.
- Pyron, A., & Wiens, J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543–583. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.012>
- Regalado, A. (2011). *Plan De Manejo Reserva Natural Biotopo Selva Húmeda Municipio De Barbacoas, Departamento De Nariño*.
- Rodríguez, R., Araya, M., Gray, D., Reichert, M., Symes, L., Wilkins, M., ... Höbel, G. (2015). How acoustic signals scale with individual body size: Common trends across diverse taxa. *Behavioral*

- Ecology*, 26(1), 168–177. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru174>
- Roithmair, M. (1992). Territoriality and Male Mating Success in the Dart-poison Frog, *Epipedobates femoralis* (Dendrobatidae, Anura). *Ethology*, 92(4), 331–343. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1992.tb00970.x>
- Roithmair, M. (1994). Male Territoriality and Female Mate Selection in the Dart-Poison Frog *Epipedobates trivittatus* (Dendrobatidae, Anura). *Copeia*, 1994(1), 107. <https://doi.org/10.2307/1446676>
- Rosenblum, E. (2006). Convergent Evolution and Divergent Selection: Lizards at the White Sands Ecotone. *The American Naturalist*, 167(1), 1. <https://doi.org/10.2307/3491243>
- Ryan, M. J. (1990). Sexual Selection, Sensory Systems and Sensory Exploitation. *Science*, 283(5405), 1083a – 1083. <https://doi.org/10.1126/science.283.5405.1083a>
- Salazar, J. (2005). Algunos cicádidos de colombia (homoptera: cicadidae). *Centro de Museos- Museo de Historia Natural, Manizales*, (December 2005).
- Salgado, B. (2016). La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones. En *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia*. 236 pp.
- Santos, J., Baquero, M., Barrio, C., Coloma, L., Erdtmann, L., Lima, A., & Cannatella, D. (2014). Aposematism increases acoustic diversification and speciation in poison frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1796), 20141761–20141761. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1761>
- Santos, J., & Cannatella, D. (2011). Phenotypic integration emerges from aposematism and scale in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6175–6180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010952108>
- Santos, J., Coloma, L., & Cannatella, D. (2003). Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12792–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133521100>
- Santos, J., Coloma, L., Summers, K., Caldwell, J., Ree, R., & Cannatella, D. (2009). Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. *PLoS Biology*, 7(3), 0448–0461. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000056>
- Seddon, N. (2005). Ecological adaptation and species recognition drives vocal evolution in neotropical subsocial birds. *Evolution*, 59(1), 200. <https://doi.org/10.1554/04-300>
- Silverstone, P. (1976). A revision of the Poison-Arrow Frogs of the Genus *Phyllobates* Family Dendrobatidae. *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin*, 27, 1–53.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution*, 47(1), 264. <https://doi.org/10.2307/2410134>
- Smith, J. (1997). The Behavior of Communicating, after Twenty Years. En *Contributions to Management Science* (pp. 7–53). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1745-4_2
- Solís, R., & Penna, M. (1997). Testosterone levels and evoked vocal responses in a natural population of the frog *Batrachyla taeniata*. *Hormones and Behavior*, 31(2), 101–109. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1366>
- Stebbins, R., & Cohen, N. (1995). A Natural History of Amphibians. En *Princeton University Press*,

Princeton. <https://doi.org/10.1086/419406>

- Stewart, M., & Rand, S. (1991). Vocalizations and the Defense of Retreat Sites by Male and Female Frogs, *Eleutherodactylus coqui*. *Copeia*, 1991(4), 1013. <https://doi.org/10.2307/1446096>
- Sueur, J. (2018). *Sound Analysis and Synthesis with R*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77647-7>
- Sullivan, B., & Malmos, K. (1994). Call variation in the Colorado River toad Behavioral and phylogenetic implications. *Herpetologica*, 50(2), 146–156. Recuperado de <https://eurekamag.com/research/030/392/030392589.php>
- Summers, K., Weight, L., Boag, P., & Bermingham, E. (1999). The evolution of female parental care in poison frogs of the genus *Dendrobates*: Evidence from mitochondrial DNA sequences. *Herpetologica*, 55(2), 254–270.
- Symula, R., Schulte, R., & Summers, K. (2001). Molecular phylogenetic evidence for a mimetic radiation in Peruvian poison frogs supports a Müllerian mimicry hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1484), 2415–2421. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1812>
- Tarvin, R., Powell, E., Santos, J., Ron, S., & Cannatella, D. (2017). The birth of aposematism: High phenotypic divergence and low genetic diversity in a young clade of poison frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109(January), 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.035>
- Technologies, S. (2014). STATGRAPHICS® Centurion XVII User Manual. *Gestión*, pp. 1–13.
- Ten, G. (2005). Arginine vasotocin activates advertisement calling and movement in the territorial Puerto Rican frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Hormones and Behavior*, 47(2), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.10.005>
- Tubaro, P. (1999). Bioacústica aplicada a la sistemática, conservación y manejo de poblaciones naturales de aves. *Etología*, 7, 19–32.
- Twomey, E., Vestergaard, J., & Summers, K. (2014). Reproductive isolation related to mimetic divergence in the poison frog *Ranitomeya imitator*. *Nature Communications*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms5749>
- Urbina, J., & Londoño, M. (2003). Distribución de la comunidad de herpetofauna asociada a cuatro áreas con diferente grado de perturbación en la Isla Gorgona, Pacífico colombiano. *Herpetofauna*, 27(51), 105–113.
- Vargas, F., & Amézquita, A. (2013). Stream Noise, Hybridization, and Uncoupled Evolution of Call Traits in Two Lineages of Poison Frogs: *Oophaga histrionica* and *Oophaga lehmanni*. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077545>
- Vargas, F., & Amézquita, A. (2014). Abiotic noise, call frequency and stream-breeding anuran assemblages. *Evolutionary Ecology*, 28(2), 341–359. <https://doi.org/10.1007/s10682-013-9675-6>
- Vélez, A., Hödl, W., & Amézquita, A. (2012). Sound or silence: Call recognition in the temporal domain by the frog *allobates femoralis*. *Ethology*, 118(4), 377–386. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02021.x>
- Vences, M., Kosuch, J., Lötters, S., Widmer, A., Jungfer, K., Köhler, J., & Veith, M. (2000). Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15(1), 34–40. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0738>
- Vences, M., Verlag, F., Kosuch, J., Boistel, R., Haddad, C., La Marca, E., & Lotters, S. (2003).

- Convergent evolution of aposematic coloration in Neotropical poison frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Organisms, Diversity and Evolution*, 3, 215–226.
- Vences, M., Wahl, G., Hoegg, S., Glaw, F., Spinelli, E., Meyer, A., & Perry, S. (2007). Molecular systematics of mantelline frogs from Madagascar and the evolution of their femoral glands. *Biological Journal of the Linnean Society*, 92(3), 529–539. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00859.x>
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). *Amphibians and Reptiles Herpetology*.
- Wells, K. (1977). The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25, 666–693. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(77\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-3472(77)90118-X)
- Wells, K. (1980). Behavioral ecology and social organization of a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 6(3), 199–209. <https://doi.org/10.1007/BF00569201>
- Wells, K. (1988). *The effects of social interactions on anuran vocal behavior*.
- Wells, K. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Recuperado de <http://www.bibliovault.org/BV.landing.epl?ISBN=9780226893341>
- Wells, K., & Schwartz, J. (2006). The Behavioral Ecology of Anuran Communication. En *Hearing and Sound Communication in Amphibians* (pp. 44–86). https://doi.org/10.1007/978-0-387-47796-1_3
- Wells, K., & Taigen, T. (1986). The effect of social interactions on calling energetics in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19(1), 9–18. <https://doi.org/10.1007/BF00303837>
- Weygoldt, P. (1987). Evolution of parental care in dart poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 25(1), 51–67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1987.tb00913.x>
- Wilczynski, W., Rand, S., & Ryan, M. (2001). Evolution of calls and auditory tuning in the *Physalaemus pustulosus* species group. *Brain, Behavior and Evolution*, 58(3), 137–151. <https://doi.org/10.1159/000047268>

ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de señalización visual en anuros. Modificado de: *Visual signaling in anuran amphibians communication*. Fuente: (Hodl & Amézquita, 2001)

SEÑAL	DESCRIPCIÓN
EXTREMIDADES	
Temblor del dedo del pie (TDP) <i>Toe trembling</i>	Sacudir, vibrar o mover el dedo del pie sin intervención de la pierna. Los dedos del pie se pueden mover secuencialmente en forma de onda, asociado a avistamiento de rivales potenciales en interacciones agonísticas.
Levantar el pie posterior (LPP) <i>Hind foot lifting</i>	Levantar un pie posterior sin extender la pierna y volverlo a poner en el suelo, el pie levantado puede temblar en forma simultánea, se ha documentado solo durante encuentros agonísticos.
Agitar el brazo (AB) <i>Arm waving</i>	Levantar un brazo y moverlo de arriba abajo, los movimientos pueden o no realizarse en un patrón temporal, se ha documentado solo durante encuentros agonísticos.
Temblor de extremidades (TE) <i>Limb shaking</i>	Movimientos rápidos con temblor arriba-abajo de una mano o pie, el movimiento puede repetirse varias veces antes de que la pierna vuelva a posición de descanso, se realiza comúnmente en el transcurso de la orientación y en encuentros agonísticos.
Limpiando (LI) <i>Wiping</i>	Mover la mano o el pie sobre el suelo sin levantarlo, difiere de la sacudida en que la mano o el pie permanece en contacto con el sustrato, se realiza durante despliegues de anuncio.
Estirando las piernas (EP) <i>Leg stretching</i>	Estirar una o ambas patas traseras rápidamente al nivel del sustrato, esta puede o no permanecer extendida durante algún tiempo y ocurre en contextos agonísticos.
Pie Bandera (PB) <i>Foot flagging</i>	Levantar una o ambas patas traseras extendiéndolas lentamente hacia afuera y hacia atrás en un arco por encima del nivel del sustrato, a la extensión máxima los pies pueden vibrar o los dedos de los pies pueden extenderse, se realiza durante exhibiciones de machos y encuentros agonísticos.
CUERPO	
Bajando el cuerpo (BC) <i>Body lowering</i>	Bajar la parte anterior del cuerpo presionándola contra el sustrato, las extremidades pueden permanecer presionadas a los costados del cuerpo o pueden extenderse, se puede realizar durante el cortejo o las interacciones agonísticas, en este último caso se cree que señala la sumisión.
Postura erguida (PER) <i>Upright posture</i>	Extender los brazos en ángulo y levantar la parte anterior del cuerpo, puede ocurrir antes de caminar hacia un intruso o antes de mostrar la gula, ocurre después del avistamiento de posibles rivales y por lo tanto en contextos agonísticos.
Visualización del saco vocal (VG) <i>Throat display</i>	Inflar el saco vocal comportamiento que puede ir acompañado de vocalización después de adoptar una postura erguida.
Levantamiento del cuerpo (LC) <i>Body raising</i>	Elevar el cuerpo extendiendo las cuatro patas, puede representar el inicio de sacudidas corporales, se realiza en las etapas iniciales de las interacciones agonísticas y de cortejo.
Inflación corporal (IC) <i>Body inflation</i>	Aumentar el tamaño corporal aparentemente bombeando aire al cuerpo, durante las interacciones agonísticas y de cortejo.
Sacudidas corporales (SC) <i>Body jerking</i>	Movimientos largos con el cuerpo hacia adelante y hacia atrás de manera repetida sin un patrón aparente sin levantar las manos o pies del suelo, se realiza durante encuentros agonísticos.
Correr y saltar (CS) <i>Running-jumping display</i>	Correr rápidamente hacia adelante, atrás o hacia los lados a lo largo del sustrato, puede ir acompañado de elevamiento de los pies delanteros desde el suelo.

Anexo 2. Promedio de medidas en variables espectrales (Hz) y variables temporales en ambos sitios de muestreo

INDIVIDUO CÓDIGO	ESPECIE <i>Epipedobates</i>	SITIO	LOW FREQ (Hz)	HIGH FREQ (Hz)	PEAK FREQ (Hz)	DURACIÓN (s)	PULSOS	NOTAS
1023	<i>boulengeri</i>	Maragricola	4931,77	6001,05	5749,37	0,2757	14	4
0905	<i>boulengeri</i>	Maragricola	4694,69	6157,89	5453,29	0,228	11,437	4
1012	<i>boulengeri</i>	Maragricola	4468,62	5944,97	5395,4	0,3082	16,407	4,727
1555	<i>boulengeri</i>	Maragricola	4598,46	6050,42	5420,36	0,200	10,909	5,111
1605	<i>boulengeri</i>	Maragricola	4620,99	6310,91	5553,43	0,165	8,850	6,888
006	<i>narinensis</i>	Biotopo	4686,28	6862,68	5919,84	0,1464	6,465	10,5
007	<i>narinensis</i>	Biotopo	4644,04	6116,13	5515,54	0,1541	6,661	11,142
008	<i>narinensis</i>	Biotopo	4641,24	6561,51	5745,29	0,0997	5,509	7,375
009	<i>narinensis</i>	Biotopo	4816,48	6102,03	5564,66	0,1905	6,933	8,5
010	<i>narinensis</i>	Biotopo	4750,39	5914,81	5412,42	0,1400	6,717	10,6

Anexo 3. Medidas morfométricas 24 individuos (mm). Datos obtenidos de la colección Herpetológica PSO, Universidad de Nariño, 2018

COD	Especie	LRC	AC	AB	LA	LT	LF	LP	IO	IN	D3	E
1760	<i>E. boulengeri</i>	15,4	5,5	5,1	3,6	7,5	5,6	9,1	2,5	2,3	0,3	2,6
1767	<i>E. boulengeri</i>	15,5	5,4	5	4,6	7,1	5,9	8,5	2,2	2,1	0,4	2,7
1749	<i>E. boulengeri</i>	18	5,4	5,1	4,6	7,7	7,6	9,2	2,2	2,4	0,4	2,5
1761	<i>E. boulengeri</i>	17,6	5,7	5	4,3	7,7	7,9	9,6	2,2	2,7	0,6	2,7
1756	<i>E. boulengeri</i>	17,3	5,6	5	4,4	7,9	7,6	9,5	2,4	2	0,4	2,6
1755	<i>E. boulengeri</i>	16	5,6	5	4,2	7,4	7,3	8,5	2,4	2,2	0,8	2,5
1759	<i>E. boulengeri</i>	16,4	5,6	5,5	5,4	7,3	7,9	9,6	2,2	2,5	0,6	2,6
1757	<i>E. boulengeri</i>	16,9	6,1	5,1	4	7,9	7,7	8,5	2	2,1	0,6	2,5
1748	<i>E. boulengeri</i>	16,8	5,5	5,2	4,5	7,8	7,4	9,4	2,6	2,3	0,5	2,9
1766	<i>E. boulengeri</i>	17,1	5,6	5,4	4,4	8,2	7,6	9,9	2,5	2,3	0,6	2,6
1754	<i>E. boulengeri</i>	17,7	5,6	5,4	4,9	7,5	7,7	9,5	2	2,5	0,6	2,5
1753	<i>E. boulengeri</i>	16,6	5,2	4,6	5	8,4	6,3	9,4	2,4	2,6	0,3	2,5
1765	<i>E. boulengeri</i>	15	5,3	4,6	4,1	7,4	7,4	7,5	2,4	2,2	0,5	2,6
1764	<i>E. boulengeri</i>	17,6	5,4	5	4,9	8	8,3	9,4	2,2	2,1	0,5	2,6
1752	<i>E. boulengeri</i>	16,3	5,8	5	4,6	7,6	7,5	9,6	2,1	2,3	0,4	2,7
1758	<i>E. boulengeri</i>	15,6	5,2	4,6	4,2	7,6	7,5	8,1	2,3	2	0,7	2,7
1763	<i>E. boulengeri</i>	14	5	4,5	4,2	7	6,8	9,6	2,2	2,5	0,5	2,7
1762	<i>E. boulengeri</i>	15,6	5,3	4,6	4,2	7,7	7,5	9,5	2,6	2,3	0,4	2,7
1751	<i>E. boulengeri</i>	16,7	5,6	4,9	4,6	7,5	7,6	9,9	2,1	2,4	0,6	2,7
1750	<i>E. boulengeri</i>	14,6	4,9	4,8	3,9	6,6	6,8	8	2,5	2,2	0,4	2,7
140	<i>E. narinensis</i>	18,3	5,8	5,2	4,4	8,2	8,1	9,9	2,2	2,4	0,7	2,5
142	<i>E. narinensis</i>	15,7	5,2	4,9	4,2	7,4	8,2	9,1	2,4	2,5	0,4	2,5
878	<i>E. narinensis</i>	15,2	5,5	5,1	4,6	7,9	8,1	9,4	2,5	2,2	0,4	2,8