



**Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias Biológicas**

**Evolución desacoplada entre emisor y receptor en la comunicación de las ranas
del complejo *Allobates femoralis*.**

**Tesis de grado como requisito parcial para optar por el título de Magister en
Ciencias Biológicas – Área Biología**

Mileidy Betancourth-Cundar

Código

201122446

Director

Adolfo Amézquita Torres, PhD

Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Bogotá, Colombia

Julio de 2014

**Evolución desacoplada entre emisor y receptor en la comunicación de las ranas del complejo
Allobates femoralis.**

Mileidy Betancourth-Cundar, BSc

Director: Adolfo Amézquita, PhD

Grupo de Ecofisiología, Comportamiento y Herpetología – GECHO, Departamento de Ciencias
Biológicas, Universidad de los Andes.

ABSTRACT

Acoustic communication allows carrying a message from a sender to a receiver producing behavior changes. Frogs are recognized by use acoustic signals for communication. In a system where evolutionary changes on sender do not generate a concomitant adjustment in the receiver, the communication and recognizing species fail; however, a possible decoupling between these two elements has been rarely studied. *Allobates femoralis* is categorized as a cryptic species complex for their great morphological, genetic and acoustic variation. It is an excellent model of amphibian to study mechanisms of perception and signal recognition by receivers. To test whether geographic variation in signal is correlated with geographic changes in recognition in the male-male communication system of *A. femoralis* complex, we quantify male recognition of calls with two, three and four notes using playback experiments in eight localities of the Amazonian basin. Moreover, we rebuild the ancestral states historical of number of notes character in a phylogenetic framework and we evaluated whether the number of notes per call of the most recent common ancestor predicted the relative response at two, three and four notes. We found that the probability of response to advertisement calls of *A. femoralis* males was strongly influenced by the call mid-frequency and the number of notes. The recognition was complete for own calls and partially for alotopic calls in some populations; however, in other populations no differences in recognition at two, three and four notes were found. Our evidence, as well as that provided by the comparative methods, supports the hypothesis of decoupled evolution between sender and receiver in the male-male communication system of *A. femoralis* complex, likewise, this draws attention to the use of bioacoustics in studies of systematics and taxonomy, since not always, different calls mean different species.

RESUMEN

La comunicación acústica permite llevar un mensaje desde un emisor hasta un receptor generando cambios en su comportamiento. Los anuros son reconocidos por usar señales acústicas para comunicarse. En un sistema donde cambios evolutivos en el emisor no generen un ajuste concomitante en el receptor, el reconocimiento de especie fallaría; sin embargo, rara vez se ha estudiado un eventual desacople entre estos dos elementos. *Allobates femoralis* es catalogado como un complejo de especies crípticas dada su gran variación morfológica, genética y acústica, convirtiéndola en un excelente modelo de anfibio para estudiar mecanismos de percepción y reconocimiento de señales por parte de los receptores. Para evaluar si variación geográfica en la señal coincide con cambios geográficos en el reconocimiento en el sistema de comunicación macho-macho del complejo *A. femoralis*, cuantificamos el reconocimiento de los machos a dos, tres y cuatro notas mediante experimentos de playback en ocho localidades de la Amazonia, estimamos los estados ancestrales del carácter número de notas en un marco filogenético y evaluamos si el estado del carácter número de notas del ancestro común más reciente predice la respuesta relativa a dos, tres y cuatro notas. La probabilidad de respuesta a los cantos de advertencia de los machos de *A. femoralis* estuvo fuertemente influenciada por la frecuencia promedio de canto y el número de notas. El reconocimiento fue total para cantos propios y parcial para cantos alotópicos en algunas poblaciones; en otras, no se encontraron diferencias en el reconocimiento a dos, tres y cuatro notas. Esta evidencia al igual que la aportada por los métodos comparativos apoya la hipótesis de evolución desacoplada entre emisor y receptor en el sistema de comunicación macho-macho del complejo *A. femoralis*. De igual forma, llama la atención sobre el uso de bioacústica en estudios de sistemática y taxonomía, ya que no siempre, cantos diferentes significan especies diferentes.

Palabras clave: Evolución desacoplada, anuros, comunicación, emisor, receptor, *Allobates femoralis*.

INTRODUCCION

La comunicación acústica es un proceso de transmisión cooperativa de información desde un individuo, el emisor, a otro, el receptor, generando cambios en su comportamiento (Green & Marler 1979, Wiley 1994, Gerhardt & Huber 2002, Bradbury & Vehrencamp 2011). Los anuros son reconocidos como animales que se comunican acústicamente (Ryan 1988, Gerhardt & Huber 2002). La evolución de las señales auditivas ha sido estudiada principalmente evaluando la influencia de factores abióticos (Wiley & Richards 1978, Richards & Wiley 1980, Forrest 1994, Vargas-Salinas & Amézquita 2013), bióticos (Greenfield 1994, Gerhardt & Schwartz 1995) y desde el punto de vista de las variaciones en la señal que pueden desarrollar los emisores (Gerhardt & Huber 2002); sin embargo, la percepción auditiva y las reacciones comportamentales que pueden desarrollar los receptores es poco conocida (Wilczynski et al., 1993, Dawkins & Guilford 1996, Gerhardt & Huber 2002). Las señales auditivas evolucionan bajo fuertes presiones de selección y son importantes en procesos de selección sexual, reconocimiento de especies, sistemas de apareamiento, establecimiento y defensa de territorios o encuentros agonísticos en muchos grupos animales (Gerhardt 1994, Owings & Morton 1998, Schwartz & Gerhardt 1998). Los cantos de advertencia por su conspicuidad, fácil obtención y análisis, son ampliamente utilizados en taxonomía como características especie-específicas o indicadores de aislamiento reproductivo (Blair 1958, Gerhardt 1988, Schneider & Sinsch 2006, Vences & Wake 2007, Funk et al., 2012, Caminer & Ron 2014).

Una expectativa común acerca del orden de los cambios evolutivos que se pueden dar entre emisores y receptores corresponde a que estos dos componentes coevolucionan gradualmente, ya que la interacción recíproca tiene efectos sobre el éxito reproductivo (Gerhardt & Huber 2002); por lo tanto, un cambio importante en las señales acústicas debería implicar un cambio en el procesamiento sensorial y reconocimiento por parte de los receptores. En un sistema donde los cambios en el emisor no generen un ajuste en el receptor, la comunicación se perdería y el reconocimiento de especie también fallaría; este proceso de evolución acoplada entre señal y reconocimiento se ha evidenciado en sistemas de comunicación macho-hembra como es el caso de la rana Túngara, *Engystomops pustulosus*, donde la presencia de cantos complejos y la preferencia de las hembras se ha originado múltiples veces en linajes cercanamente emparentados (Ron 2008). Sin embargo, existe otra posibilidad, en la que nuevas señales pueden tener significancia en la comunicación y podrían haberse mantenido gracias a un sesgo sensorial preexistente, lo cual sugiere un escenario de evolución desacoplada entre emisor y receptor (Ryan 1990, Arak & Enquist 1993, Endler & Basolo 1998, Gerhardt & Huber 2002), aunque pocos estudios ha puesto a prueba esta hipótesis (Ryan 1990, Ryan & Rand 1990, Ryan et al., 1992), en el mismo complejo de ranas de *E. pustulosus* se ha encontrado evidencia a favor de evolución desacoplada entre señal y reconocimiento; en estas ranas el éxito reproductivo de los machos depende de la producción de cantos complejos, y las hembras reconocen mejor señales alotópicas o inexistentes en la naturaleza que sus propios cantos, lo que implica que la preferencia a este rasgo evoluciono antes que el mismo carácter (Ryan 1990, Ryan & Rand 1990). De esta forma, dentro de un mismo complejo de especies no es claro como señal y reconocimiento han evolucionado. Dado que los sistemas de

percepción pueden variar dependiendo del tipo de receptor (Ryan & Brenowitz 1985, Anderson & McGregor 1999), es importante evaluar esta hipótesis en otros sistemas, como en el sistema de comunicación macho-macho en el cual el éxito reproductivo no depende de la complejidad de los cantos, sino más bien de otras características, como el tamaño y defensa exitosa de un territorio (Roithmair 1992). Aunque se ha sugerido que los machos presentan un sistema sensorial más relajado que las hembras (Wilczynski & Ryan 1999, Gerhardt 1994), en especies territoriales donde el reconocimiento de intrusos conespecíficos es clave para tener éxito reproductivo, se esperaría que el sistema sensorial este acoplado a la señal.

Allobates femoralis (Anura: Aromobatidae) es una rana ampliamente distribuida en la cuenca Amazónica (Silverstone 1976) que no puede catalogarse como una entidad homogénea, sino más bien como un complejo de especies crípticas (Simões et al., 2008), ya que presenta alta variación acústica (propiedades temporales del canto) (figura 3), fenotípica (tamaño y coloración) y considerable divergencia genética (Amézquita et al., 2009). Estudios sobre la comunicación en esta rana (Amézquita et al., 2005, 2006, 2009, Simões et al., 2008, de Luna et al., 2010, Vélez et al., 2012) sugieren que es un excelente modelo para evaluar mecanismos de percepción y reconocimiento de señales acústicas por parte de los receptores. Los cantos de advertencia para la localidad tipo están constituidos por la repetición de grupos de cuatro notas cortas, moduladas en frecuencia, las cuales son utilizadas para la defensa de su territorio de machos conespecíficos y para atraer a las hembras. Como en otras especies de anuros (Roithmair 1992, Summers 1992, Pröhl 1997, Pröhl & Hödl 1999, Summers 2000), el éxito reproductivo de los machos está fuertemente relacionado con la posesión, tamaño y defensa exitosa de un territorio (Roithmair 1992); así, un macho que falla en la detección de intrusos conespecíficos se arriesga no sólo a perder su territorio, sino también las oportunidades de apareamiento.

Diferentes estudios sugieren que una combinación de parámetros espectrales y temporales del canto de advertencia de *A. femoralis* son necesarios para el reconocimiento de intrusos conespecíficos (Amézquita et al., 2005, 2006) y que no reconocerlos implica costos importantes en la tenencia de territorios y por tanto en el éxito reproductivo (Roithmair 1992). De igual forma, se ha registrado que los machos de *A. femoralis* responden a supra estímulos en características espectrales (frecuencia) que se encuentran fuera de la variación natural (Amézquita et al., 2011). Sin embargo, rara vez se considera la posibilidad de que la existencia de variación geográfica en las señales no implique variación en el reconocimiento, es decir, que los receptores reconozcan señales alotópicas como propias. Dada la variación geográfica en el número de notas que presenta el complejo *A. femoralis* permite probar la hipótesis sobre si los mecanismos de reconocimiento de señales evolucionan de manera acoplada con variaciones en la señal misma. La aceptación de esta hipótesis simple representa el punto de partida de muchos estudios taxonómicos, de comunicación y especiación.

El propósito central de este estudio fue evaluar la hipótesis de evolución acoplada en el sistema de comunicación macho-macho del complejo *A. femoralis*, es decir, si variación geográfica en la

producción de la señal genera cambios geográficos sincrónicos en el reconocimiento. Evaluamos esta hipótesis a partir de dos aproximaciones, evidencia comportamental y métodos filogenéticos comparativos. Para la primera aproximación, suponemos tres escenarios que negarían, o apoyarían parcial o totalmente la hipótesis central del estudio (Figura 1). En el primer escenario, a manera de hipótesis nula, esperaríamos que la probabilidad de reconocimiento por parte de los machos sea igual para las tres variaciones en el número de notas (dos, tres y cuatro notas). Este resultado indicaría evolución totalmente desacoplada. En el escenario opuesto, el espacio de reconocimiento estaría perfectamente acoplado al espacio de la señal “*matched-spaces hypothesis*” en Amézquita et al. (2011) y los machos reconocerían únicamente la variante del canto que corresponde a su misma población; es decir, si una población canta con dos notas, los machos solo reconocerán los estímulos con dos notas. Por último, planteamos un escenario intermedio que incluye una gama de posibilidades, en las que el reconocimiento por los machos del complejo *A. femoralis* sería parcial para los cantos de otras poblaciones y total para los cantos propios, lo cual sugeriría un escenario de evolución desacoplada. Con respecto al contexto filogenético planteamos dos escenarios, 1). Si el reconocimiento y la evolución de la señal presentan tasas de cambio similares, es decir evolucionan acopladamente, esperaríamos que cada linaje reconociera únicamente la variación en el número de notas de su misma población, es decir si un linaje canta con tres notas, este solo reconocerá sus propios cantos (Figura 2a) y 2). Si las tasas de cambio entre señal y reconocimiento son diferentes esperaríamos que el estado del carácter número de notas del ancestro común más reciente predice la respuesta relativa a dos, tres y cuatro notas, por lo tanto, un clado reconocerá con mayor probabilidad sus propios cantos y parcialmente la variación en el número de notas que presentaron sus antiguos parientes. Por ejemplo, si un clado que canta con dos notas se derivó de uno de cuatro notas probablemente aun reconozca los cantos de cuatro notas. Este escenario indicaría que la señal está cambiando más rápido que el reconocimiento (Figura 2b), sugiriendo evolución desacoplada entre estos dos rasgos. Para evaluar esta hipótesis planteamos los siguientes objetivos, 1) cuantificar el reconocimiento a dos, tres y cuatro notas por los machos del complejo *A. femoralis* mediante experimentos de *playback*, en ocho poblaciones de la Amazonia 2) reconstruir el carácter número de notas en un marco filogenético y 3) Evaluar si el estado del carácter número de notas del ancestro más reciente predice la respuesta relativa a dos, tres y cuatro notas.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

Recopilamos información de 14 localidades distribuidas a través de la cuenca amazónica con variación en el número de notas (Anexo 2) (Amézquita et al., 2009, Simões et al., 2010), las cuales fueron usadas para la reconstrucción de estados ancestrales. Las llamadas de advertencia muestran variación que va desde cantos compuestos por una nota (Ecuador) (Read 2000) hasta dos, tres y cuatro notas (Amézquita et al., 2009). Buena parte de la variación está correlacionada con distancia geográfica y variación genética (Amézquita et al., 2009), o específicamente con barreras geográficas

(Simões et al., 2008). Para evaluar si existe reconocimiento diferencial en los cantos de *A. femoralis* en cuanto al número de notas completamos y evaluamos experimentos de ocho localidades (Figura 3). Las llamadas consisten de dos notas para *Allobates hodli* en la localidad de Catuaba (latitud -10.0742, longitud -67.6249), tres notas en Panguana, Perú (-9.6137, -74.9355), y cuatro notas en las seis localidades restantes: Leticia (-4.1233, -69.9491), Hiléia (-3.1977, -60.4425), Reserva Forestal Adolpho Ducke (-2.9333, -59.9744), Careiro (-3.3547, -59.8605), Treviso (-3.1491, -54.8403) y Aratai (3.9907, -52.5901) (Amézquita et al., 2009).

Grabación y análisis de las señales auditivas

Para la realización de los experimentos en todas las localidades seguimos estrictamente la metodología propuesta por Amézquita et al. (2006, 2005). El protocolo consistió en los siguientes pasos:

1. Ubicamos el territorio de un macho y realizamos grabaciones de los cantos de advertencia de *A. femoralis*, sin capturar los individuos para evitar perturbaciones en el estado motivacional de los machos. Las grabaciones consistieron entre tres y 34 llamadas consecutivas. Usamos una grabadora Sony WM D6C o Marantz PMD660 y un micrófono AKG D-190-E o Shure BG4.1, posicionado en frente de cada macho a una distancia entre 0.5m a 1.5m.
2. Analizamos las grabaciones de los cantos de advertencia teniendo en cuenta propiedades temporales y espectrales del canto. Esta información fue empleada para la elaboración de estímulos sintéticos. Las grabaciones fueron digitalizadas a 22 kHz, el formato de los archivos fue Aiff (Audio Interchange File Format) y la resolución fue de 16 bit. Los parámetros espectrales de los cantos fueron calculados mediante un espectro de poder (Window: Blackman, DFT: 2048 samples, 3 dB filter bandwidth: 18.5 Hz) con el software RavenPro 1.4 (Charif et al., 2004). Los datos de tres llamados por macho fueron promediados y constituyeron la mínima unidad para los análisis estadísticos. Los parámetros espectrales calculados fueron: frecuencia pico, alta y baja y los temporales fueron: duración de la llamada, intervalo inter-llamada, duración de la nota e intervalo inter-nota. Los parámetros de alta y baja frecuencia fueron medidos a 20 dB (re 20 μ Pa) por debajo de la intensidad pico, en este valor la energía de la señal aún podía distinguirse claramente del ruido de fondo. La terminología y los procedimientos para el análisis de cantos fueron realizados de acuerdo con Cocroft & Ryan (1995).

Síntesis de estímulos experimentales

Los estímulos fueron sintetizados usando el software SoundEdit 2.0.3 (Weary & Weisman 1993) de acuerdo con los parámetros espectrales y temporales promedio de cada población. Inicialmente sintetizamos los estímulos "control" para cada población de acuerdo a los valores promedio para cada parámetro. Posteriormente realizamos la síntesis de los estímulos experimentales cambiando sistemáticamente el número de notas y la frecuencia con base en los parámetros de la población de Leticia (Amézquita et al., 2005).

Para evaluar el efecto a dos, tres y cuatro notas en la respuesta fonotáctica y simular mejor las llamadas naturales de los machos de *A. femoralis* sintetizamos tres series de llamadas, la primera, incluyendo la variación a cuatro notas con los parámetros espectrales y temporales promedio de canto de la población de Leticia. La segunda, correspondiente a los estímulos de tres notas, fueron elaborados con la primera nota, el intervalo entre la segunda y la tercera nota, la tercera nota, el intervalo entre la tercera y la cuarta nota y la cuarta nota del canto promedio; y la tercera serie para los estímulos de dos notas, consistió de la primera nota, el intervalo entre la segunda y la tercera nota y la cuarta nota del canto promedio (Amézquita et al., 2005). Para incluir las variaciones en frecuencia se sintetizaron una serie entre 12 a 15 estímulos por cada variación en el número de notas. En cada estímulo se varió simultáneamente los parámetros de alta y baja frecuencia de cada nota pero manteniendo constantes las propiedades temporales promedio de canto. El rango de frecuencias de llamada de los estímulos estuvo entre -8.3 a 10 (cada 1.67 DE) desviaciones estándar de la frecuencia dominante de cada población. Este rango de frecuencias estuvo por fuera de la variación natural de cada población. La variación en la frecuencia fue incluida para facilitar una comparación directa con estudios previos sobre reconocimiento de las señales por los receptores, con *A. femoralis* y con otras especies territoriales (Amézquita et al., 2005, 2006, 2011, Rojas et al., 2006) y para facilitar la construcción de las curvas de probabilidad de respuesta.

Para generar réplicas de cada estímulo alteramos aleatoriamente las características del canto no evaluadas dentro de una desviación estándar del valor promedio, sin alterar los parámetros correspondientes a los factores experimentales (frecuencia de canto y número de notas por llamada). Para este análisis, un número al azar (entre 0 y 1) fue multiplicado por la desviación estándar de cada parámetro temporal y el valor resultante fue sumado o restado (acorde con un segundo número) al promedio poblacional de dicha característica. Se sintetizaron entre 21 a 30 réplicas de los estímulos para cada variación en el número de notas. Después de la síntesis de todos los estímulos, éstos fueron reanalizados usando RavenPro 1.4 (Charif et al., 2004) y los valores obtenidos para cada parámetro fueron usados para los análisis posteriores. Una descripción más detallada de esta metodología es realizada por Amézquita et al. (2005).

Experimentos de *Playback*

Para la realización de los experimentos de *playback* seguimos la metodología propuesta por Hödl et al. (2004) y Amézquita et al. (2005) y (2006). Estos experimentos se realizaron en los periodos de mayor actividad vocal de los machos de *A. femoralis*, generalmente en horas de la mañana, entre las 05:30 y 11:00 horas y en horas de la tarde entre 14:30 y 18:25 horas (Roithmair 1992). Para disminuir el riesgo de pseudoreplicación de los tratamientos de *playback* no realizamos experimentos con el mismo macho, sin embargo, cuando esto no fue una alternativa un máximo de dos experimentos por macho fue realizado, pero separados por un periodo de tiempo de una tarde o una noche. De igual forma nunca se evaluó dos réplicas del estímulo con el mismo macho.

Los experimentos consistieron en ubicar un macho vocalmente activo y colocar un parlante (Sony SRS-A27, Sony SRS-A47, o Sony SRS-57, Sony Corp., Tokyo) en dirección al macho entre 100 a 230cm de distancia. Esta distancia dependió de la probabilidad de atenuación del sonido por la vegetación y las condiciones del terreno. Los estímulos fueron realizados a un nivel de presión del sonido (SPL) entre 75-80 dB (re 20 μ Pa), simulando las condiciones naturales de otro macho, cantando a esa distancia (Amézquita et al., 2005); al final de cada *playback* se midió el SPL del estímulo con un sonómetro (Sound-Level Meter RO-1350 Roline, Rotronic AG, Bassersdorf, Switzerland) en la posición inicial del macho de interés. Mediante el uso de una grabadora digital (Panasonic SI-SX320, Panasonic Corp., Secaucus, NJ, o Silva Schneider, Anif Anif, Austria CDP 286 AS) reproducimos el canto sintético. Para los cantos de cuatro notas, por ejemplo, este estímulo tuvo una duración máxima de 220 segundos, el cual consistió en 10 “*bouts*” consecutivos (18 a 22 s por *bout*), cada “*bout*” estuvo compuesto por 10 llamadas sintéticas (9 a 11 s de duración) y un intervalo de silencio de duración similar (9 a 11 s).

El reconocimiento del estímulo se cuantificó mediante una respuesta fonotáctica, si el macho se aproximó a una distancia de 30 cm del parlante se consideró como una respuesta positiva. La respuesta comportamental de los machos fue bastante evidente y muy rápida: si los cantos son interpretados como un intruso que pone en peligro la propiedad del territorio, el macho se aproxima rápidamente al parlante (30 cm de distancia). Si el macho analizado no se aproximó al parlante, se consideraron dos posibilidades, 1) el macho no reconoció el sonido como propio o 2) no está interesado en el estímulo y/o en combatir. Para distinguir entre estas dos opciones usamos un segundo estímulo, el cual consistió en un canto “control” sintetizado de acuerdo a características espectrales y temporales promedio de su misma población. Si el macho se aproximó al parlante, el estímulo previo fue considerado como una respuesta negativa, es decir que efectivamente el canto no fue reconocido como un intruso conoespecífico. Si el macho no reconoció este estímulo el experimento fue descartado del análisis. En resumen, codificamos los experimentos como una respuesta binaria, positivo para el caso donde el *playback* generó una respuesta (el macho se aproximó al parlante) y negativa cuando el macho no respondió al estímulo pero sí reconoció el canto control.

Utilizamos una respuesta fonotáctica como criterio para estimar el espacio de reconocimiento de la señal porque una fonotaxis positiva indica tres condiciones: primero, que el individuo estimulado detectó la señal, segundo, que fue hábil para localizar el estímulo y tercero que reconoció dicho estímulo como la llamada de un intruso, el cual impone una amenaza sobre la propiedad de su territorio y por lo tanto debe asumir costos potenciales asociados con su defensa. La respuesta fonotáctica ha sido empleada en estudios previos sobre el reconocimiento de señales en el sistema de comunicación macho-macho de *A. femoralis* y otras especies territoriales (Amézquita et al., 2005, 2006, 2011, Rojas et al., 2006, Vélez et al., 2012), por lo tanto, su empleo facilita una comparación directa con dichos estudios.

Análisis estadístico

Para cuantificar el reconocimiento a cada variante del número de notas por los machos de *A. femoralis*, la variable respuesta fue analizada como binaria (1-0). Los machos reconocieron el estímulo, aproximándose al parlante (1), o fallaron en el reconocimiento (0). Estos datos fueron analizados utilizando un modelo aditivo generalizado – GAM (Hastie & Tibshirani 1990), en el cual los predictores correspondieron a la frecuencia media (kHz) como parámetro espectral y el número de notas (2, 3 y 4 notas) como parámetro temporal. Estos modelos, a diferencia de los modelos lineales generalizados-GLM, construyen el análisis realizando un ajuste “smooth” isotrópico de los predictores, es decir, incorporan funciones no paramétricas que se adaptan mejor a relaciones no lineales entre los datos, lo cual permite incluir variables que no se ajustan a una distribución normal (Hastie & Tibshirani 1990, Wood 2006), como la variable binaria de nuestro estudio (variable respuesta con distribución binomial). Realizamos este análisis usando el paquete ‘mgcv’ (Mixed GAM Computation Vehicle with GCV/AIC/REML smoothness estimation) (Wood 2011), implementado en el software R. Dado que estamos probando la misma hipótesis evaluando ocho poblaciones, la probabilidad de cometer un error tipo I aumenta, por lo tanto realizamos una corrección de Bonferroni (Holm 1979) mediante la fórmula $p = \alpha / k$ donde α correspondió a un valor de 0.05 y $k =$ número de comparaciones (8), para un valor de $p = 0.00625$.

Reconstrucción de estados ancestrales

La reconstrucción de caracteres ancestrales es un método que utiliza una hipótesis filogenética y una distribución de estados de carácter en los taxones observados (ubicados en las terminales de las ramas), para intentar reconstruir los estados del carácter en los nodos ancestrales (Madisson & Madisson 2011).

El interés de este estudio no implicó establecer las relaciones filogenéticas entre las diferentes poblaciones del complejo *A. femoralis*, sin embargo, no existe una hipótesis filogenética robusta para este complejo de especies, por lo tanto, realizamos un análisis filogenético empleando 91 secuencias de dos genes mitocondriales, Citocromo b (Cyt b) con 357 pares de bases (p.b.) y 16S con 508 p.b. Las secuencias fueron obtenidas de los estudios de Amézquita et al. (2009), Simões et al. (2010) y de la base de datos de GenBank (Anexo 2). *Allobates zaparo* fue usado como grupo externo. Para la obtención de secuencias homólogas realizamos un alineamiento utilizando MUSCLE (Edgar 2004), implementado en Geneious (Drummond et al., 2010), el cual fue corregido visualmente. Para estimar las relaciones filogenéticas utilizamos dos aproximaciones, un análisis por máxima verosimilitud (ML; Felsenstein 1981) y un análisis Bayesiano (Rannala & Yang 1996). Dichos análisis fueron realizados con el alineamiento concatenado de los dos genes. El análisis de ML fue realizado en el programa MEGA V.6. (Tamura et al., 2013), con 2000 réplicas de bootstrap para evaluar el soporte de los nodos y bajo el modelo de sustitución nucleotídica T92+G (Tamura 3-parametros) el cual fue seleccionado bajo el Criterio de Información Bayesiano implementado en el software JModelTest 2.1.3 (Darriba et al., 2012). La filogenia bayesiana fue inferida usando Beast V

1.7.5 (Drummond & Rambaut 2007) bajo los parámetros de proceso de Yule como previo para el árbol y el modelo de evolución HKY+G el cual fue considerado el más similar a T92+G dadas las restricciones del software. El análisis se realizó bajo un muestreo de 30 millones de generaciones, muestreando cada 1000 y descartando los primeros 7500 árboles (25%). La convergencia de las cadenas fue examinada usando Tracer (Rambaut & Drummond 2007) y para la representación de las relaciones filogenéticas entre los clados usamos el árbol de máxima credibilidad de clados.

Teniendo en cuenta que nuestro interés fue reconstruir los estados ancestrales para cada nodo entre las poblaciones de *A. femoralis* y por otro lado reducir el trabajo computacional en el análisis de reconstrucción de estados ancestrales, realizamos otro análisis filogenético bajo las mismas aproximaciones y parámetros mencionados previamente (a excepción de un burnin del 50%), pero seleccionando aleatoriamente un individuo por población. Previamente se ha registrado que este procedimiento no tiene efectos en los resultados (Cadena et al., 2007, Cadena et al., 2010) y además la mayoría de las poblaciones (excepto dos individuos en la población de Panguana) formaron clados monofiléticos. De igual forma, las relaciones filogenéticas entre las dos aproximaciones fueron concordantes.

Las relaciones filogenéticas mediante las dos aproximaciones (ML y análisis bayesiano) fueron similares, por lo tanto estimamos los estados ancestrales para el carácter número de notas bajo el árbol de máxima credibilidad de clado obtenido en el análisis bayesiano. Este carácter fue analizado como discreto-nominal con cuatro estados: uno, dos, tres y cuatro notas. La reconstrucción cuantificó la probabilidad de que un linaje ancestral haya presentado cada estado de un carácter. Empleamos el algoritmo “*rerootingMethod*” implementado en el paquete Phytools (Revell 2012) de R, el cual usa verosimilitud para encontrar los estados ancestrales de cada nodo que maximizan la probabilidad de llegar al estado observado bajo un modelo estocástico de evolución (Schluter et al., 1997, Pagel 1999). Empleamos el modelo MK1 (Markov k-state 1 parameter model) (Lewis 2001) o “ER” (en el lenguaje de R), el cual emplea un único parámetro la tasa de cambio entre los estados, donde algún cambio en particular, por ejemplo, de dos a tres notas o de tres a cuatro notas, tiene la misma probabilidad de ocurrir.

Dado que algunos nodos presentaron bajo soporte en los análisis filogenéticos, realizamos la estimación de estados ancestrales para el carácter número de notas considerando la incertidumbre filogenética. Para este análisis empleamos 15.000 árboles post-burnin obtenidos en el análisis bayesiano con las muestras reducidas, usamos el modelo MK1 y el criterio de máxima verosimilitud. De igual forma resumimos el patrón de cambio de este carácter bajo todos los árboles. Este análisis fue realizado usando el software Mesquite (Madisson & Madisson 2011) y la representación se realizó bajo el árbol de máxima credibilidad obtenido del análisis bayesiano.

Cuantificación de la respuesta relativa

Para comparar la respuesta relativa a cada estímulo (p.ej. cantos de dos notas vs. tres y cuatro notas), calculamos el área bajo la curva (AUC) de la probabilidad de respuesta, estimada por los modelos GAM para cada uno de dichos estímulos. El AUC para cada estímulo fue calculado con el paquete MESS (Miscellaneous esoteric statistical scripts) implementado en el software R (Ekstrom 2013). La respuesta relativa para cada estímulo fue re-calculada como una proporción respecto a la curva de reconocimiento que representó la máxima respuesta, la cual generalmente correspondió a al reconocimiento de los estímulos de su misma población. Esta variable fue utilizada en el análisis para evaluar si la posición filogenética de los clados predice la respuesta relativa a dos, tres y cuatro notas. Mapeamos cada variación en el número de notas en la filogenia y lo representaremos gráficamente integrando únicamente el reconocimiento de las ocho poblaciones a dos, tres y cuatro notas donde realizamos los experimentos.

RESULTADOS

Evaluamos ocho poblaciones distribuidas en la cuenca amazónica con un total de 593 experimentos de *playback*. Los predictores del modelo número de notas y/o frecuencia media explicaron significativamente la variación en la probabilidad de respuesta de los machos de *A. femoralis*. El porcentaje de variación explicada por estos dos predictores oscilo entre el 32,8% para la población de Hiléia a 60% de la variación, en la población de Leticia. De acuerdo con nuestras aproximaciones gráficas la mayor probabilidad de respuesta de los machos para las tres variaciones en el número de notas se presentó en los valores promedio de la frecuencia pico de cada población, los cuales oscilan entre 2,87 kHz (Ducke) y 3,44 kHz (Aratai) (Figura 4, Tabla 1).

Los machos de *A. femoralis* respondieron a todas las variantes en el número de notas; sin embargo, en algunos casos la probabilidad de reconocimiento varió de acuerdo con el número de notas en la llamada (Figura 4). Las poblaciones Treviso y *A. hodli* (Catuaba) no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la probabilidad de reconocimiento a las tres variantes en el número de notas (p -valor=0.052 y 0.452, respectivamente) (Tabla 1). Las poblaciones que cantan con cuatro notas presentaron un patrón similar, donde la mayor probabilidad de reconocimiento correspondió a cuatro notas, luego a tres notas y por ultimo a dos notas (Tabla 1, Figura 4). La población que canta con tres notas (Panguana) representó un caso particular, aunque hubieron diferencias significativas en el reconocimiento a la tres variantes en el número de notas (p -valor = 0.010), el mayor reconocimiento se presentó a llamadas compuestas por cuatro notas, que a sus propios cantos (tres notas) (Figura 4). Aplicando la corrección de Bonferroni ($p=0.00625$) no existen diferencias significativas en el reconocimiento a dos, tres y cuatro notas en todas las poblaciones evaluadas (Tabla 1). El espacio de reconocimiento para cuatro poblaciones (Hiléia, Careiro, Aratai y Treviso) fue mucho más amplio respecto a los valores de frecuencia promedio de cada población a diferencia de las poblaciones de Leticia y Ducke donde las probabilidades de reconocimiento disminuyeron drásticamente con valores por encima y/o por debajo de la frecuencia promedio de cada población.

Los análisis filogenéticos realizado a partir de genes mitocondriales (Cyt b y 16s) sugieren alta estructura genética entre las poblaciones de estudio, alta divergencia genética inter-poblacional con respecto a la intra-poblacional. De igual manera confirman los resultados previamente obtenidos por otros autores (Simões et al., 2010), donde existen dos clados basales, el primero conformado por *A. zaparo* el cual representa el grupo hermano de todo el complejo y el segundo conformado por *A. hodli* y las poblaciones de Acre y Madre de Dios (Figura 5). Es importante mencionar que relaciones filogenéticas entre las poblaciones de Treviso y Aratai son ambiguas, ya que hay diferencias en las relaciones mostradas por las aproximaciones de ML y bayesiana, sin embargo, los soportes para estos nodos en los dos análisis son bajos (soporte por bootstrap=59, probabilidad posterior=35) (Figura 5).

La hipótesis de reconstrucción ancestral más probable para el número de notas (figura 6a) indica que la probabilidad de que el ancestro del complejo *A. femoralis* haya cantado con cuatro notas es del 53%; el 47% restante se reparte entre las demás variantes del número de notas, lo cual indica que la reconstrucción hacia los nodos basales es ambigua y no permite inferir cual variante en el número de notas estuvo presente en los linajes ancestrales. En los linajes más recientes del análisis filogenético la reconstrucción se vuelve más consistente con un ancestro de cuatro notas (100% de probabilidad), de esta manera el único cambio que se puede inferir con mayor probabilidad es el de cuatro a tres notas, para un linaje recientemente derivado correspondiente a la población de Panguana (Figura 6a).

El análisis de estimación de estados ancestrales incorporando la incertidumbre filogenética mostró resultados similares, donde el estado ancestral para el carácter número de notas en los nodos basales es ambiguo y la probabilidad es mayor hacia ancestros de cuatro notas en los nodos más derivados (Anexo 1). De esta manera, los resultados y las inferencias realizadas no se ven afectados por la incertidumbre filogenética ya que el análisis incorporó una gran muestra de árboles probables obtenidos de la distribución posterior del análisis bayesiano. El resumen de los cambios para el carácter número de notas sobre todos los árboles indicó siete posibles cambios (Tabla 2), de los cuales los que están presente en más del 50% de los árboles son: de cuatro a una nota (promedio=0.55 veces, rango=0-1) en el 55% de los árboles, de dos a cuatro notas (promedio=1.3 veces, rango=0-2) en el 78% de los árboles y de cuatro a tres notas (promedio=1 veces, rango=1-1) en el 100% de los árboles (Tabla 2).

Los resultados sobre el reconocimiento a dos, tres y cuatro notas sugieren que todas las poblaciones independientemente del número de notas en su canto de advertencia, reconocen las tres variantes del canto. La mayor respuesta relativa para todas las poblaciones se presentó a los cantos de su misma población, a excepción de la población que canta con tres notas, la cual presenta mayor reconocimiento al estímulo de cuatro notas (Figuras 4 y 6b).

DISCUSIÓN

Nuestro estudio sugiere que la probabilidad de respuesta a los cantos de advertencia de los machos de *A. femoralis* está fuertemente influenciada por dos características, una espectral que corresponde a la frecuencia promedio de las llamadas de cada población y una temporal, correspondiente al número de notas. Como se había registrado en estudios previos (Amézquita et al. 2005, 2006), la curva de probabilidad de respuesta de los machos presentó una profunda disminución hacia frecuencias que están por encima o por debajo del promedio poblacional.

Nuestros resultados permiten rechazar con fuerte evidencia la predicción planteada bajo el escenario de espacios ajustados (*matched-spaces*), en el cual las poblaciones de estudio solo reconocerían los cantos que presentan la variación en el número de notas de su misma población. Por lo tanto, nuestros datos no apoyan un proceso de evolución acoplada entre el número de notas y el reconocimiento. De esta manera, la evidencia apoya la hipótesis de evolución desacoplada entre emisor y receptor, sin embargo, cuál de los dos escenarios restantes es apoyado por nuestros datos, depende de la población de estudio. En las poblaciones de Catuaba (*A. hodli*) y Treviso (*A. femoralis*) no se encontraron diferencias en el reconocimiento a dos, tres y cuatro notas apoyando el escenario nulo, donde la probabilidad de reconocimiento por los machos es igual para las tres variaciones en el número de notas. En las poblaciones que cantan con cuatro notas existen diferencias en la probabilidad de reconocimiento a cada variación en el número de notas, es decir, que los machos reconocen con mayor probabilidad los cantos de advertencia de su misma población, pero también reconocen otras variantes del número de notas (dos y tres notas); esta evidencia apoya la hipótesis de escenarios intermedios, en la cual consideramos que los machos reconocen con mayor probabilidad sus propios cantos y parcialmente cantos alotópicos. Teniendo en cuenta la corrección de Bonferroni todas las poblaciones corresponden con el escenario nulo; esta corrección nos permitió discriminar cual escenario de evolución desacoplada (hipótesis nula o escenarios intermedios) se adapta mejor a cada población, pero en ningún momento contradice nuestra hipótesis central de estudio.

La reconstrucción ancestral para el carácter número de notas en el complejo *A. femoralis* al igual que el análisis incorporando la incertidumbre filogenética, resultaron ambiguos hacia los nodos basales, es decir que los cuatro estados del carácter número de notas son compatibles con los estados observados en el presente; por lo tanto esta estimación no permite inferir cuál fue el estado ancestral de este carácter, sin embargo, en los linajes más recientes hay una mayor consistencia con el estado ancestral de cuatro notas; de igual forma éste estado es el que se encuentra en la mayoría de las poblaciones del complejo, de las 44 poblaciones registradas (Simões et al., 2010), el 79.5% cantan con cuatro notas (35 poblaciones). Por otro lado, el alto número de cambios que se presentaron en este carácter, probablemente está asociado a que el cambio en el número de notas es raro y a la incertidumbre en la reconstrucción de estados ancestrales hacia los nodos basales. La incertidumbre se incrementa a medida que aumenta la longitud de los brazos y la probabilidad de cambio hacia nodos basales, es decir, que brazos más largos tienen mayor

probabilidad de cambiar (Schluter et al., 1997). De igual forma, el único cambio que se puede inferir con mayor certeza es de cuatro a tres notas en la población de Panguana.

Con respecto a nuestra hipótesis filogenética los resultados encontrados al igual que la evidencia comportamental, nos permiten rechazar el escenario de evolución acoplada entre señal y reconocimiento. Existe mayor soporte para el escenario de evolución desacoplada, donde el reconocimiento evoluciona más lentamente que la señal. No podemos determinar si la posición filogenética de un clado predice el reconocimiento a las variaciones en el número de notas, ya que la estimación de los estados ancestrales fue ambigua hacia los nodos basales y todas las poblaciones reconocen las tres variaciones en el número de notas; aunque, si tenemos en cuenta que el cambio a tres notas se dio en un linaje relativamente reciente las poblaciones más basales como *A. hodli*, Aratai y/o Treviso no deberían reconocer esta variación a tres notas. Por lo tanto, la mayor evidencia apunta a que el estado del carácter número de notas del ancestro más reciente no predice la respuesta relativa a dos, tres y cuatro notas. Sin embargo, un caso particular se presentó en la población de Panguana, el cual mencionamos a continuación. Por otra parte, se ha sugerido que un sistema de acople perfecto entre emisor y receptor no permite que el sistema evolucione, de esta manera el sistema de reconocimiento no es evolutivamente estable, ya que los sesgos sensoriales siempre han existido como parte de la historia evolutiva de una especie (Arak & Enquist 1993).

En estudios previos donde se sugirió un mecanismo de evolución desacoplada entre emisor y receptor (Ryan 1990, Ryan & Rand 1990, Ryan et al., 1992) el sistema de comunicación empleado corresponde a macho-hembra, donde el éxito reproductivo de los machos depende exclusivamente de la capacidad de producir cantos complejos. Nuestro sistema de estudio es diferente, primero porque estamos evaluando un sistema de comunicación macho-macho y se ha sugerido que éstos presentan un sistema sensorial más relajado que las hembras (Wilczynski & Ryan 1999, Gerhardt 1994) y segundo porque el éxito reproductivo de los machos está determinado por el tamaño (0,25 a 26 m²) y la defensa exitosa de un territorio (Roithmair 1992). De esta manera para los machos del complejo *A. femoralis* probablemente, es mejor aproximarse a un estímulo que suena como un conoespecífico, antes de asumir costos más elevados o incluso perder su territorio por fallas en el reconocimiento, lo cual podría haber favorecido el mantenimiento de un sistema sensorial flexible, dada la gran variación en el número de notas que presentan *A. femoralis* (una a seis notas) (Lima, A. com. pers.). Es importante mencionar que probablemente el sistema de comunicación de los machos del complejo *A. femoralis* no corresponde a una generalización para especies territoriales, sino más bien es un caso especial de este grupo. En estudios previos, donde *A. femoralis* coexiste en el ambiente acústico con el mayor número de especies (10 especies, en Panguana) con respecto a otras localidades (Amézquita et al., 2006), se ha evidenciado que el sistema de reconocimiento de los machos a parámetros espectrales presenta un rango de variación más amplio que el rango natural de variación de la señal (Amézquita et al., 2011).

Una observación importante registrada en este estudio es el caso de la población que canta con tres notas (Panguana), en la cual la probabilidad de reconocimiento a cantos compuestos con cuatro

notas fue mayor que al canto de advertencia de su misma población (tres notas). Esto podría estar relacionado con la posición filogenética de este clado dentro del complejo *A. femoralis*, ya que su divergencia es relativamente recientemente y a partir de un ancestro que más probablemente cantaba con cuatro notas; lo que sugiere que el número de notas estaría evolucionado más rápido que el reconocimiento y por lo tanto estos machos reconocen mejor los cantos de poblaciones alotópicas (cuatro notas). Aunque las poblaciones hayan divergido en características temporales, probablemente su sistema sensorial aún reconozca los cantos de sus antiguos parientes, teniendo en cuenta que son linajes cercanamente emparentados y que la variación a cuatro notas está ampliamente distribuida; sin embargo, carecemos de réplicas para confirmar esta hipótesis. De igual forma, esta evidencia indica diferencias en la tasa de evolución entre emisor y receptor, donde el sistema de reconocimiento de los machos va más allá del rango de variación de la señal, lo cual se había sugerido previamente (Amézquita et al. 2006, 2011).

Dado que *A. femoralis* es una especie altamente territorial, una interpretación plausible para explicar el cambio a tres notas en el canto de advertencia de esta población, puede estar asociado a interacciones interespecíficas medidas por cantos, para la defensa de recursos y territorios. En Panguana, *A. femoralis* coexiste con diez especies, y con una de ellas, *Ameerega petersi*, presenta segregación temporal (Amézquita et al., 2011), solapamiento en rasgos espectrales del canto (frecuencia pico y rango de frecuencias) y en el patrón de llamado (Amézquita et al., 2006). Estas características podrían haber promovido el cambio a tres notas en esta población. Cambios en los emisores de *A. femoralis* tanto en variables temporales y espectrales para disminuir interferencia acústica con otras especies se han documentado previamente (Amézquita et al., 2006; Vélez et al., 2012), al igual que en otros Dendrobatidos (Wells 1980) y en otras especies de anfibios (Pengilly 1971, Schwartz & Wells 1984, 1985), por ejemplo, los machos de *Dendropsophus ebraccatus*, *D. phlebodes* y *D. microcephalus* (previamente género *Hyla*) presentan alta interferencia acústica y se ha registrado que estas tres especies interactúan con cantos agresivos de forma paralela probablemente por la defensa de sitios de llamado (Schwartz & Wells 1984). Territorialidad interespecífica se ha documentado en diferentes taxa principalmente en aves (Murray 1971, 1981, Robinson & Terborgh 1995, Jankowski et al., 2010) y en algunas especies de peces (Myrberg & Thresher 1974, Ebersole 1977).

Los cantos de advertencia han sido ampliamente usados en un contexto taxonómico como características únicas de las especies, muy relacionadas con los mecanismos de aislamiento reproductivo y comunicación intersexual para reducir apareamiento inter-específico (Blair 1958, Gerhardt 1988, Vitt & Caldwell 2009). Nuestro estudio sugiere que por lo menos en el sistema de comunicación macho-macho la variación en un rasgo temporal como el número de notas no está representando un mecanismo de aislamiento para la comunicación intrasexual, ya que los machos están reconociendo más de una variación en el número de notas. Sin embargo, para evaluar si efectivamente la variación en este rasgo está o no generando aislamiento reproductivo se deberían realizar experimentos comportamentales sobre la selectividad de las hembras por los diferentes tipos de cantos, aunque se ha observado que las hembras de esta especie no presentan

comportamientos territoriales y su preferencia de apareamiento parece estar asociada con otras características (Roithmair 1992). De esta manera el uso de la bioacústica como una herramienta para definir o delimitar especies en el campo de la sistemática y taxonomía debería ser empleada con cuidado, ya que no siempre cantos diferentes significan especies diferentes.

CONCLUSIONES

La variación en el número de notas por llamada y la frecuencia afectan el reconocimiento de los machos del complejo *A. femoralis*.

El sistema de comunicación macho-macho del complejo *A. femoralis* representa un mecanismo de evolución desacoplada entre emisor y receptor, lo cual se evidencio en un contexto comportamental y filogenético

La reconstrucción de caracteres ancestrales para el número de notas no permitió definir el estado ancestral más probable para este caracter, sin embargo en linajes recientes el estado de cuatro notas es el más probable.

El estado del carácter número de notas del ancestro más reciente no permite predecir la respuesta relativa a dos, tres y cuatro notas, ya que independientemente de su posición, las poblaciones reconocen las tres variaciones en el número de notas, sin embargo, la población de Panguana representó un escenario no contemplado previamente, donde el reconocimiento a señales alotópicas fue mayor que a sus propios cantos; no obstante, carecemos de réplicas poblaciones para confirmar nuestra hipótesis.

El uso de bioacústica en estudios de sistemática y taxonomía debe ser usado con cuidado, ya que no siempre cantos diferentes, significan especies diferentes.

LITERATURA CITADA

- Amézquita, A., Castellanos, L. & Hödl, W. 2005. Auditory matching of male *Epipedobates femoralis* (Anura: Dendrobatidae) under field conditions: the role of spectral and temporal call features. *Animal Behaviour*, 70, 1377-1386.
- Amézquita, A., Flechas, S. V., Lima, A. P., Gasser, H. & Hödl, W. 2011. Acoustic interference and recognition space within a complex assemblage of dendrobatid frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17058-17063.
- Amézquita, A., Hödl, W., Lima, A., Castellanos, L., Erdtmann, L. & de Araújo, M. C. 2006. Masking interference and the evolution of the acoustic communication system in the Amazonian dendrobatid frog *Allobates femoralis*. *Evolution*, 60, 1874-1887.

- Amézquita, A., Lima, A. P., Jehle, R., Castellanos, L., Ramos, O., Crawford, A. J., Gasser, H. & Hödl, W. 2009. Calls, colours, shapes, and genes: A multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog, *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98, 826-838.
- Anderson, S. & McGregor, P. K. 1999. Animal communication: what is the signal to noise ratio?. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 174-175.
- Arak, A., & Enquist, M. 1993. Hidden preferences and the evolution of signals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 340, 207-213.
- Blair, W. F. 1958. Mating call in the speciation of anuran amphibians. *American Naturalist*, 92, 27-31.
- Bradbury, J. W. & Vehrencamp, S. L. 2011. *Principles of animal communication*. Second edition. Sunderland Massachusetts USA: Sinauer Associates.
- Cadena, C. D., Cheviron, Z. A. & Funk, W. C. 2011. Testing the molecular and evolutionary causes of a 'leapfrog' pattern of geographical variation in coloration. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 402-414.
- Cadena, C. D., Klicka, J. & Ricklefs, R. E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brushfinches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 993-1016.
- Caminer, M. A. & Ron, S. R. 2014. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. *ZooKeys*, 370, 1-68.
- Clough, M. E. & Summers, K. 2000. Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70, 515-540.
- Cocroft, R. B. & Ryan, M.J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behavior*, 49, 283-303.
- Charif, R. A., Clark, C. W. & Frisrup, K. M. 2004. Raven 1.2 User's Manual (Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY).
- Darriba D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada D. 2012. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Dawkins, M. S. & Guilford, T. 1996. Sensory bias and the adaptiveness of female choice. *American Naturalist*, 148, 937-942.
- De Luna, A. G., Hödl, W. & Amézquita, A. 2010. Colour, size and movement as visual subcomponents in multimodal communication by the frog *Allobates femoralis*. *Animal Behaviour*, 79, 739-745.
- Drummond, A., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, T., Thierer, T. & Wilson, A. 2010. Geneious v 5.1. Available from <http://www.geneious.com/>
- Drummond, A. & Rambaut, A. 2007. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7:214.
- Ebersole, J. P. 1977. The adaptive significance of interspecific territoriality in the reef fish *Eupomacentrus leueostictus*. *Ecology*, 58, 914-920.

- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797.
- Ekstrom, C. 2013. MESS: Miscellaneous esoteric statistical scripts. R package version 0.1-6. <http://CRAN.R-project.org/package=MESS>.
- Endler, J. A. & Basolo, A. L. 1998. Sensory ecology, receiver biases, and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 415-420.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376.
- Forrest, T. G. 1994. From sender to receiver: propagation and environmental effects on acoustic signals. *American Zoologist*, 34, 644-654.
- Funk, W. C., Caminer, M. & Ron, S. R. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 279, 1806-1814.
- Gerhardt, H. C. 1988. Acoustic properties used in call recognition by frogs and toads. In: *The evolution of the amphibian auditory system* (Fritsch, B., Ryan, M., Wilczynski, M., Hetherington, T. & Walkowiak, W., eds), pp. 253-273, New York: Wiley.
- Gerhardt, H. C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, 293-324.
- Gerhardt, H. C. & Huber, F. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions*. Chicago: University of Chicago Press.
- Gerhardt, H. C. & Schwartz, J. J. 1995. Interspecific interactions and species recognition. In: *Amphibian Biology*. Vol. 2, Social Behavior (Heatwole, H., eds), pp. 603-632, Chipping Norton: Surrey Beatty.
- Grant, T., Frost, D. R., Caldwell, J. P., Gagliardo, R., Haddad, C. F., Kok, P. J., Means, D. B., Noonan, B. P., Schargel, E. E. & Wheeler, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299, 1-262.
- Green, S. & Marler, P. 1979. Analysis of animal communication. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol. 3, Social Behavior and Communication (Marler, P. & Vandenbergh, J. G., eds), pp. 73-158, New York: Academic Press.
- Greenfield, M. D. 1994. Synchronous and alternating choruses in insects and anurans: common mechanisms and diverse functions. *American Zoologist*, 34, 605-615.
- Hastie, T. & Tibshirani, R. 1990. *Generalized Additive Models*. London: Chapman and Hall.
- Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6, 65-70.
- Hödl, W., Amézquita, A. & Narins, P. 2004. The rôle of call frequency and the auditory papillae in phonotactic behavior in male Dart-poison frogs *Epipedobates femoralis* (Dendrobatidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 190, 823-829.
- Jankowski, J. E., Robinson, S. K. & Levey, D. J. 2010. Squeezed at the top: Interspecific aggression may constrain elevational ranges in tropical birds. *Ecology*, 91, 1877-1884.
- Lewis, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*, 50, 913-925.

- Madisson, W. & Madisson, D. 2011. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis, ver 2.75. <http://mesquiteproject.org>.
- Murray, B. G. 1971. The ecological consequences of interspecific territorial behavior in birds. *Ecology*, 52, 414-423.
- Murray, B. G. 1981. The origins of adaptive interspecific territorialism. *Biological Reviews*, 56, 1-22.
- Myrberg, A. A. & Thresher, A. E. 1974. Interspecific aggression and its relevance to the concept of territoriality in reef fishes. *American Zoologist*, 14, 81-96.
- Owings, D. H. & Morton, E. S. 1998. *Animal Vocal Communication*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pagel, M. 1999. The maximum likelihood approach to reconstructing ancestral character states of discrete characters on phylogenies. *Systematic Biology*, 48, 612-622.
- Pengilley, R. K. 1971. Calling and associated behavior of some species of *Pseudophryne* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Zoology*, 163, 73-92.
- Pröhl, H. 1997. Territorial behaviour of the strawberry poison-dart frog, *Dendrobates pumilio*. *Amphibia-Reptilia*, 18, 437-442.
- Pröhl, H. & Hödl, W. 1999. Parental investment, potential reproductive rates, and mating system in the strawberry dart-poison frog, *Dendrobates pumilio*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46, 215-220.
- Rambaut, A. & Drummond, A. 2007. Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rannala, B. & Yang, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 304-311.
- Read, M. 2000. *Frogs of the Ecuatorian Amazon: a guide to their calls*. England: Morley Read Productions, Digital media (CD).
- Revell, L. J. 2012. Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217-223.
- Richards, D. G. & Wiley, R. H. 1980. Reverberations and amplitude fluctuations in the propagation of sound in a forest: implications for animal communication. *American Naturalist*, 115, 381-399.
- Robinson, S. K. & Terborgh, J. 1995. Interspecific aggression and habitat selection in Amazonian birds. *Journal of Animal Ecology*, 64, 1-11.
- Roithmair, M. E. 1992. Territoriality and male mating success in the dart-poison frog, *Epipedobates femoralis* (Dendrobatidae, Anura). *Ethology*, 92, 331-343.
- Rojas, B., Amézquita, A. & Delgado, A. 2006. Matching and symmetry in the frequency recognition curve of the poison frog *Epipedobates trivittatus*. *Ethology*, 112, 564-571.
- Ryan, M. J. 1988. Constraints and patterns in the evolution of anuran acoustic communication. In: *The Evolution of the Amphibian Auditory System* (Fritsch, B., Ryan, M. J., Wilczynski, W., Walkowiak, W. & Hetherington, T., eds), pp. 637-677. New York: Wiley.
- Ryan, M. J. 1990. Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 157-195.
- Ryan, M. J. & Brenowitz, E. A. 1985. The role of body size, phylogeny, and ambient noise in the evolution of bird song. *American Naturalist*, 126, 87-100.

- Ryan, M. J. & Rand, A. S. 1990. The sensory basis of sexual selection for complex calls in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus* (sexual selection for sensory exploitation). *Evolution*, 44, 305-314.
- Ryan, M. J., Perrill, A. A. & Wilczynski, W. 1992. Auditory tuning and call frequency predict population-based mating preferences in the cricket frog, *Acris crepitans*. *American Naturalist*, 139, 1370-1383.
- Santos, J. C. & Cannatella, D. C. 2011. Phenotypic integration emerges from aposematism and scale in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 6175-6180.
- Santos, J. C., Coloma, L. A. & Cannatella, D. C. 2003. Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 12792-12797.
- Santos, J. C., Coloma, L. A., Summers, K., Caldwell, J. P., Ree, R. & Cannatella, D. C. 2009. Amazonian Amphibian Diversity Is Primarily Derived from Late Miocene Andean Lineages. *PLoS Biology*, 7, 3 e1000056.
- Schluter, D., Price, T., Mooers, A. & Ludwig, D. 1997. Likelihood of ancestor states in adaptive radiation. *Evolution*, 51, 1699-1711.
- Schneider, H. & Sinsch, U. 2006. Contributions of bioacoustics to the taxonomy of the Anura. In: *Amphibian Biology*, Vol. 7. Systematics (Heatwole, H. & Tyler, M., eds), pp. 2892-2932, Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons.
- Schwartz, J. J. & Gerhardt, H. C. 1998. The neuroethology of frequency preferences in the spring peeper. *Animal Behaviour*, 56, 55-69.
- Schwartz, J. J. & Wells, K. D. 1984. Interspecific acoustic interactions of the neotropical treefrog *Hyla ebraccata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14, 211-224.
- Schwartz, J. J. & Wells, K. D. 1985. Intra- and interspecific vocal behavior of the neotropical treefrog *Hyla microcephala*. *Copeia*, 1, 27-38.
- Silverstone, P. 1976. A revision of the poison-arrow frogs of the genus *Phyllobates* Bibron in Sagra (family Dendrobatidae). *Science Bulletin. Natural History Museum of Los Angeles County*, 27, 1-53.
- Simões, P. I., Lima, A. P. & Farias, I. P. 2010. The description of a cryptic species related to the pan-Amazonian frog *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Anura: Aromobatidae). *Zootaxa*, 2406, 1-28.
- Simões, P. I., Lima, A. P., Magnusson, W. E., Hödl, W. & Amézquita, A. 2008. Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: relationships with the upper Madeira River and other potential geological barriers. *Biotropica*, 40, 607-614.
- Summers, K. 1992. Mating strategies in two species of dart-poison frogs: a comparative study. *Animal Behaviour*, 43, 907-919.
- Summers, K. 2000. Mating and aggressive behaviour in dendrobatid frogs from Corcovado National Park, Costa Rica: a comparative study. *Behaviour*, 137, 7-24.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

- Vargas-Salinas, 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 e77545.
- Velez, A., Hödl, W. & Amézquita, A. 2012. Sound or Silence: Call Recognition in the Temporal Domain by the Frog *Allobates femoralis*. *Ethology*, 118, 1-10.
- Vences, M. & Wake, D. B. 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. In: *Amphibian Biology*, Vol. 7. Systematics (Heatwole, H. & Tyler, M., eds), pp. 2613–2670, Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons.
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, 3rd edition. San Diego: Academic Press.
- Weary, D. & Weisman, R. 1993. SoundEdit v. 2.0.3. *Animal Behavior*, 45, 417-418.
- Wells, K. D. 1980. Behavioral ecology and social organization of a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 6, 199-209.
- Wilczynski, W., & Ryan, M. J. 1999. Geographic variation in animal communication systems. In: *Geographic variation in behavior* (Foster, S. A. & Endler, J. A., eds), pp. 234–261, New York: Oxford Univ, Press.
- Wilczynski, W., McClelland, B. E. & Rand, A. S. 1993. Acoustic, auditory, and morphological divergence in three species of neotropical frog. *Journal of Comparative Physiology A*, 172, 425-438.
- Wiley, R. H. 1994. Errors, exaggeration, and deception in animal communication. In: *Behavioral mechanisms in evolutionary ecology* (Real, L., eds), pp. 157–189, Chicago: University of Chicago Press.
- Wiley, R. H. & Richards, D. G. 1978. Physical constraints on acoustic communication in the atmosphere: implications for the evolution of animal vocalizations. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 3, 69-94.
- Wood, S. N. 2006. *Generalized Additive Models: An Introduction with R*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC.
- Wood, S. N. 2011. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society (B)*, 73, 3-36.

FIGURAS

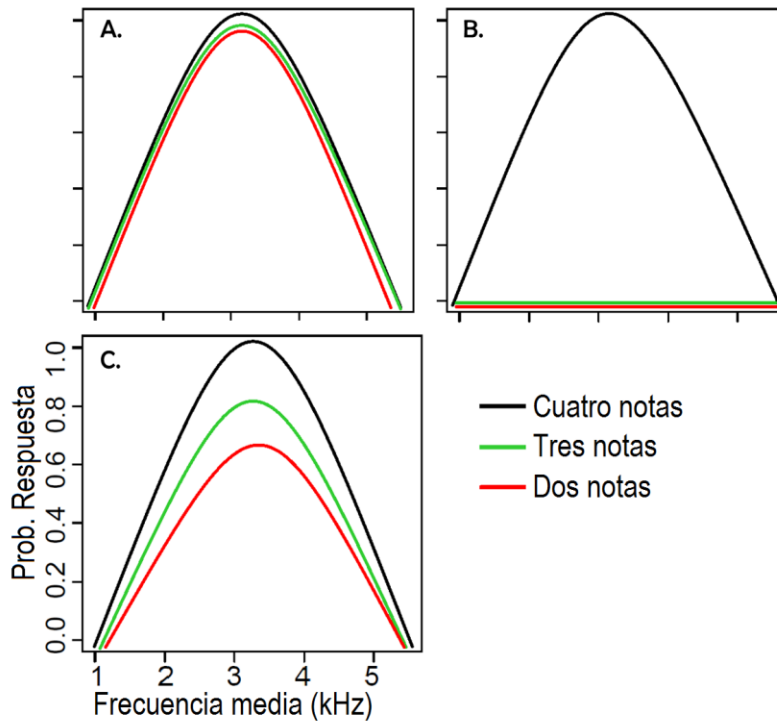


Figura 1: Curvas de probabilidad de respuesta fonotáctica teniendo los predictores frecuencia promedio y número de notas. Representamos como ejemplo una población que canta con cuatro notas. (A) Escenario nulo donde la población responde a todas las variaciones en el número de notas (B) Hipótesis de espacios ajustados (*matched-spaces*) donde la población sólo reconoce la variante de número de notas que corresponde a su canto de advertencia y (C) escenario intermedio donde la población reconoce con mayor probabilidad su mismo canto pero reconoce parcialmente otras variaciones en el número de notas. Los escenarios A y C sugerirían un proceso de evolución desacoplado para señal y reconocimiento. Los colores representan las variaciones a dos notas en rojo, tres notas en verde y cuatro notas en negro.

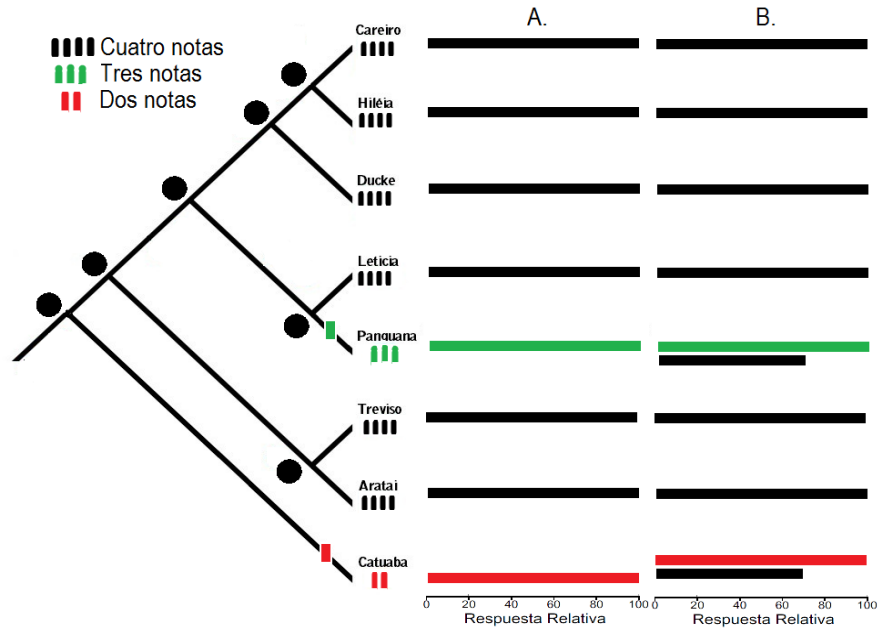


Figura 2: Predicción grafica indicando las posibles relaciones filogenéticas de las poblaciones de estudio del complejo *A. Femoralis* con base en trabajos previos (Amézquita et al. 2009, Simões et al. 2010), los estados ancestrales para el carácter número de notas y la respuesta relativa a las variaciones en el número de notas de acuerdo a los escenarios de evolución acoplada (A) y desacoplada (B) entre los caracteres número de notas y reconocimiento. Graficamos uno de los escenarios más parsimoniosos incluyendo dos cambios en el número de notas (dos y tres notas) y un ancestro de cuatro notas para todos los nodos, dado que este estado está presente en la mayoría de las poblaciones (79.5% de las poblaciones). Los colores indican el número de notas en el canto para cada población (en el árbol) y/o la respuesta relativa a dos notas en rojo, a tres notas en verde y a cuatro notas en negro.

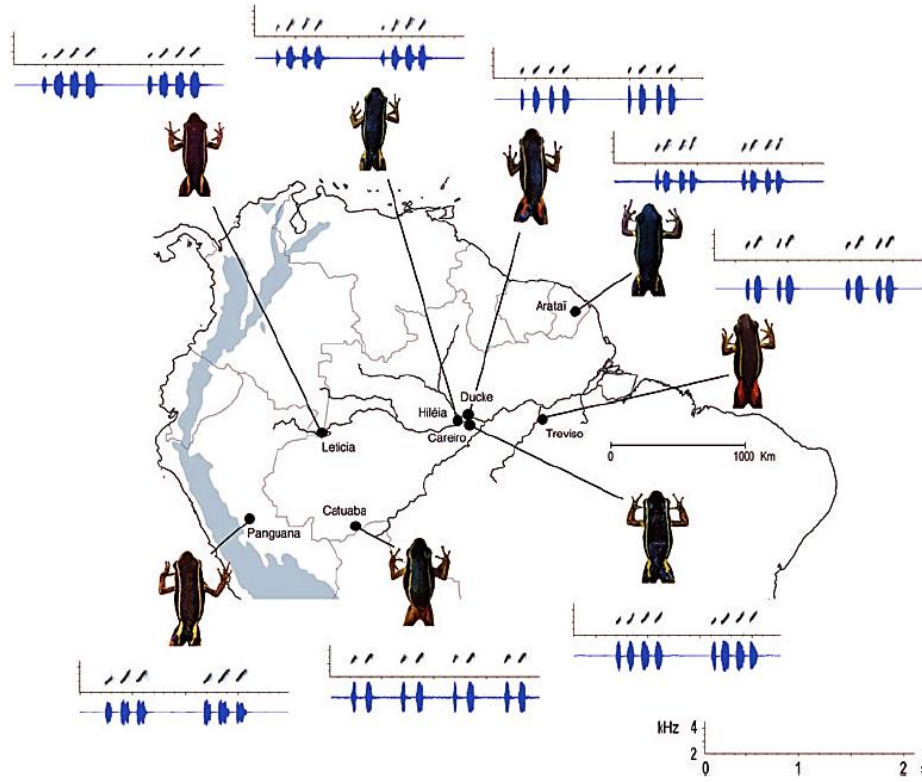


Figura 3. Distribución de las poblaciones de estudio de *A. femoralis* en la cuenca amazónica con sus respectivas representaciones de los cantos de advertencia: oscilogramas en azul y sonogramas en gris. Tomado de Amézquita et al. (2009).

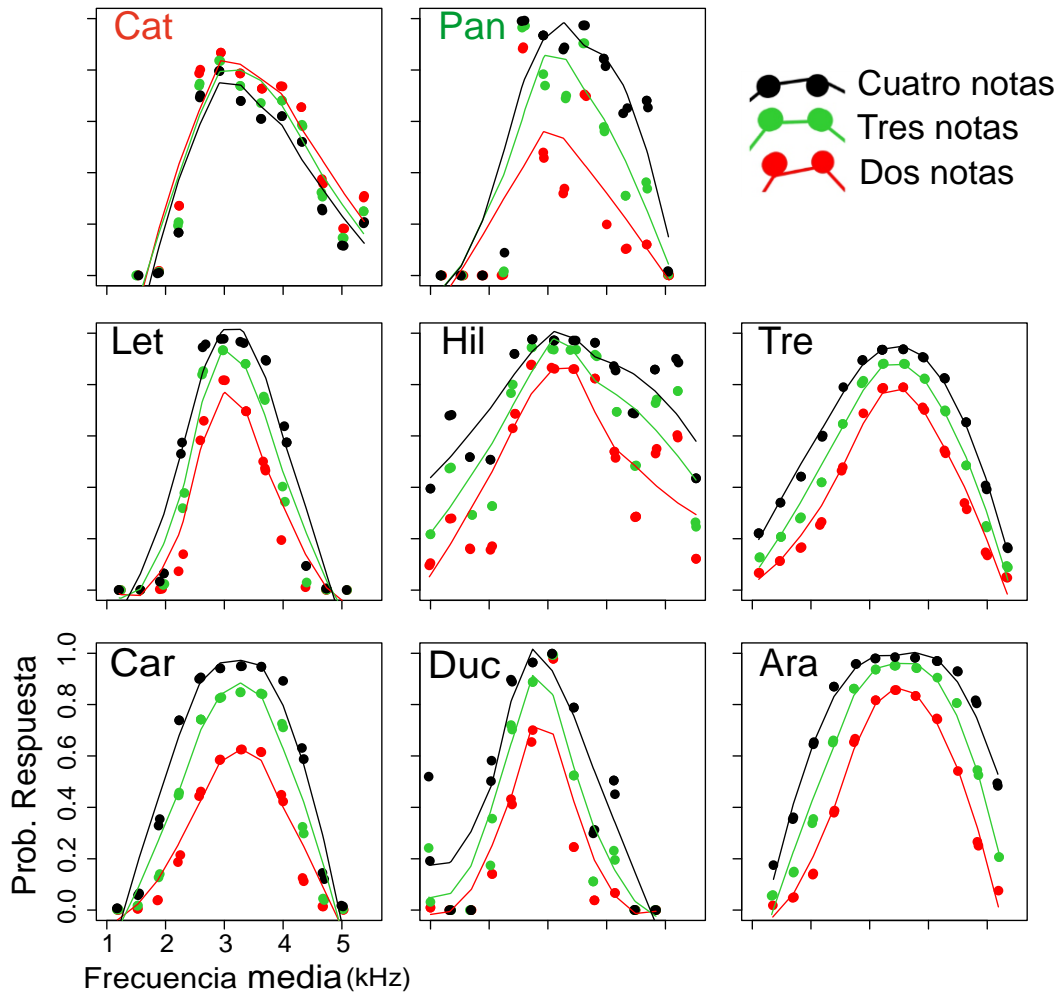


Figura 4: Probabilidades de respuesta fonotáctica predichas por los modelos GAM a partir de los experimentos de *playback* realizados con machos de ocho poblaciones de *A. femoralis*. Los estímulos sintéticos de los cantos de advertencia variaron en frecuencia y número de notas por llamada: dos notas en rojo, tres en verde y cuatro notas en negro. Las poblaciones varían en el número de notas por llamado, donde Catuaba (Cat) canta con dos notas (*A. hodli*), Panguana (Pan) con tres notas y Leticia (Let), Hiléia (Hil), Treviso (Tre), Careiro (Car), Ducke (Duc) y Arataí (Ara) presentan cuatro notas en sus cantos de advertencia y corresponden a poblaciones de *A. femoralis*.

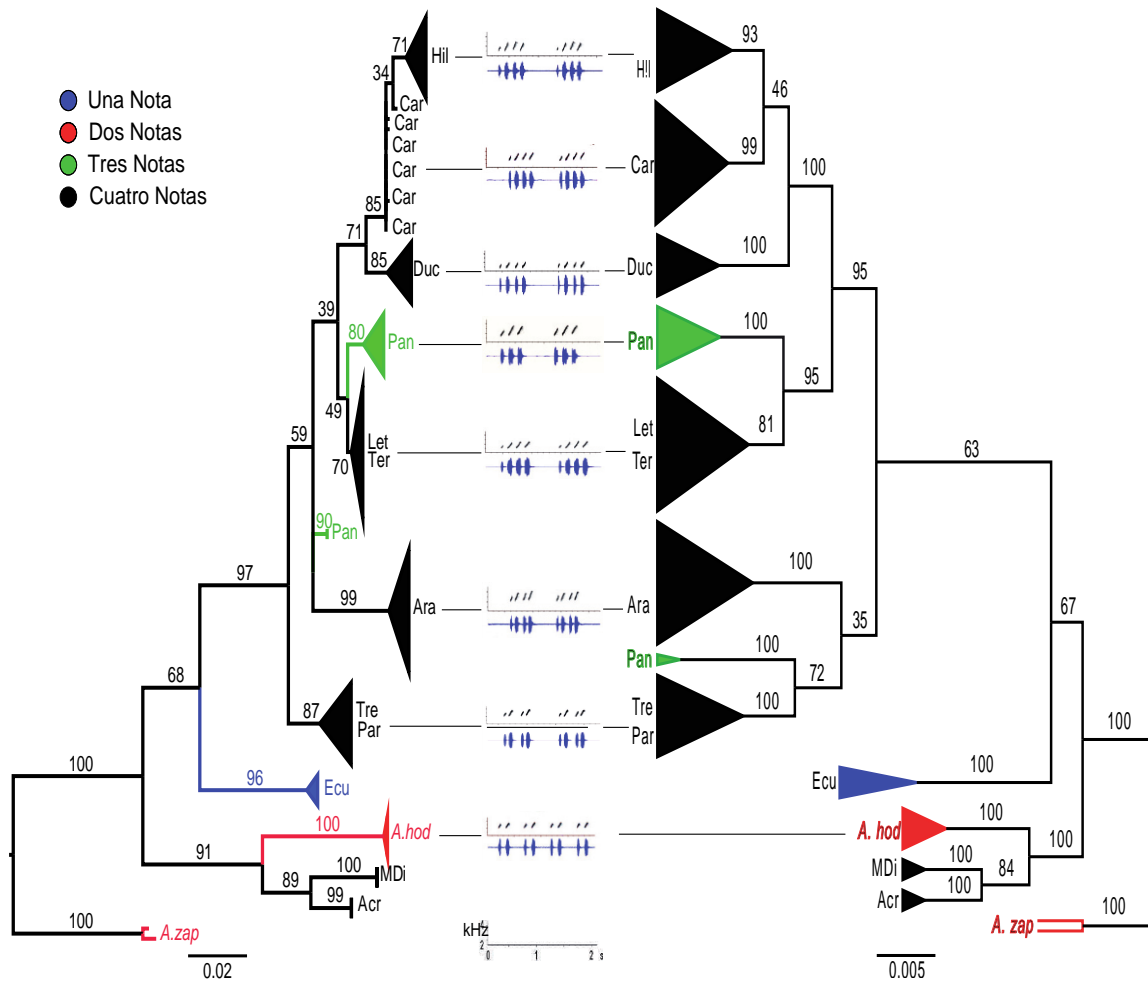


Figura 5. Hipótesis filogenéticas realizadas bajo las aproximaciones de máxima verosimilitud (a la izquierda) y bayesiana (a la derecha) a partir de 91 secuencias de los genes mitocondriales Cyt b (357p.b.) y 16s (509 p.b.). Los valores en los nodos internos indican el soporte por bootstrap y la probabilidad posterior, respectivamente. En el centro indicamos el estado actual del carácter número de notas de los cantos de advertencia (oscilogramas en azul y sonogramas en gris) para las poblaciones de estudio (Tomado de: Amézquita et al., 2009). Los colores indican la composición del número de notas: azul indica una nota, rojo dos notas, verde tres notas y negro cuatro notas. Los nombres en las puntas de las ramas se refieren a *Allobates zaparo* (*A.zap*), *A. hodli* (*A.hod*). Acre (Acr), Madre de Dios (MDi), Ecuador (Ecu), Pará (Par), Treviso (Tre), Arataí (Ara), Panguana (Pan), Terra Típica (Ter), Leticia (Let), Ducke (Duc), Careiro (Car) e Hiléia (Hil) corresponden a poblaciones de *A. femoralis*.

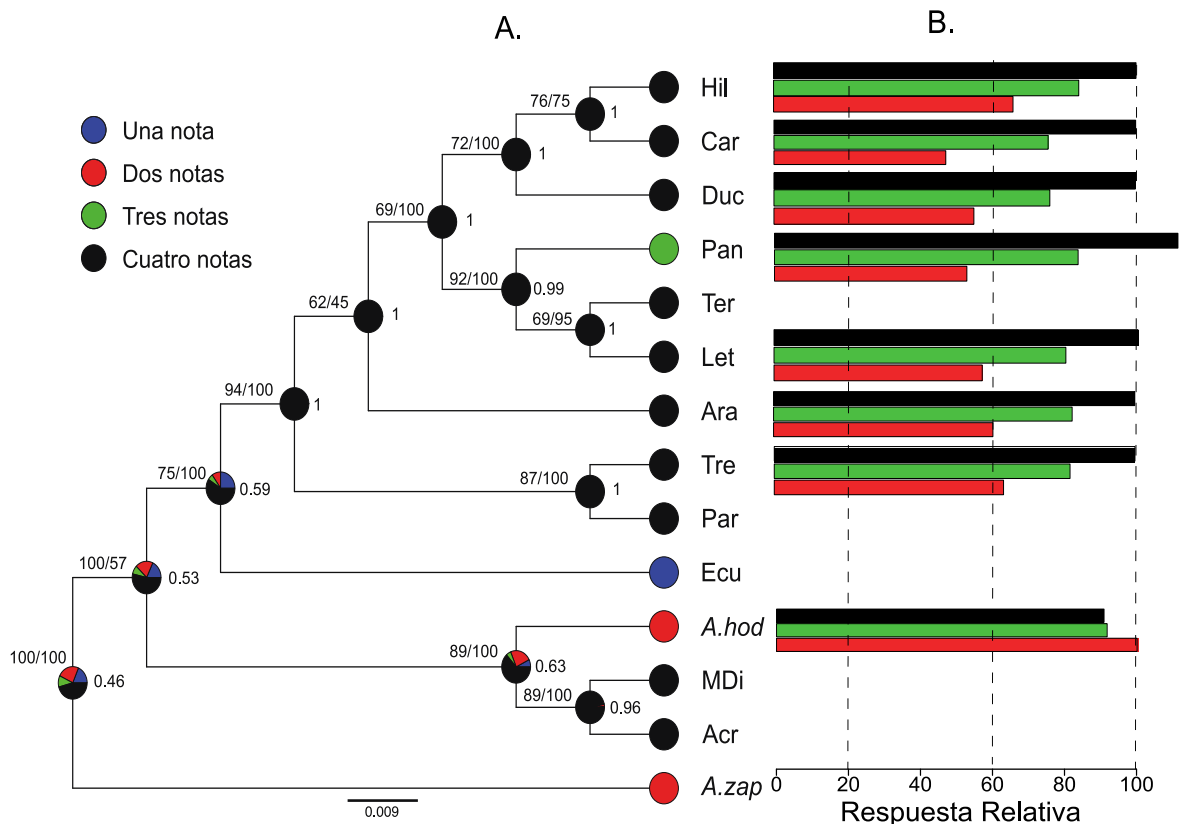


Figura 6: Reconstrucción de caracteres ancestrales para el número de notas presentes en los cantos de advertencia del complejo *A. femoralis*, en (A) y respuesta relativa a cada variación en el número de notas calculada como una proporción respecto al área bajo la curva (AUC), en (B). La estimación de estados ancestrales fue realizada con el árbol de máxima credibilidad obtenido en el análisis bayesiano, bajo el criterio de ML y el modelo MK1. Los valores asociados en frente de cada nodo indican la probabilidad de cantar con cuatro notas y los valores encima de cada nodo muestran el soporte por bootstrap y la probabilidad posterior, respetivamente. El área de los círculos en los nodos indica el soporte relativo para diferentes estados ancestrales. Los colores hacen referencia al número de notas con que cantan los animales de cada población (en el árbol) y/o la respuesta relativa. Azul indica una nota, rojo dos notas, verde tres notas y negro cuatro notas. Los nombres en las puntas de las ramas se refieren a *Allobates zaparo* (*A.zap*), *A. hodli* (*A.hod*). Acre (*Acr*), Madre de Dios (*MDi*), Ecuador (*Ecu*), Pará (*Par*), Treviso (*Tre*), Arataí (*Ara*), Panguana (*Pan*), Terra Típica (*Ter*), Leticia (*Let*), Ducke (*Duc*), Careiro (*Car*) e Hiléia (*Hil*) corresponden a poblaciones de *A. femoralis*.

TABLAS

Tabla 1: Valores de significancia (P-valor) y varianza explicada obtenidos para las ocho poblaciones de *A. femoralis* mediante los modelos aditivos generalizados – GAM, teniendo como predictores el número de notas y la frecuencia (kHz). También indicamos el número de experimentos de playback (n) realizados en cada población y la frecuencia pico promedio (kHz) para cada población. Con un asterisco se indican los valores que fueron significativos con respecto a un valor de significancia $p=0.05$.

Población	Frecuencia pico promedio (kHz)	n	P-valor		Variación explicada (%)
			No. Notas	s(Frec. media)	
Careiro	3.12	72	0.012*	0.0023*	50.7
Leticia	3.08	67	0.043*	0.0131*	60.0
Hiléia	3.10	89	0.013*	0.0065*	32.8
Rfducke	2.87	73	0.025*	0.2690	57.7
Panguana	3.07	72	0.010*	0.2030	60.2
Catuaba	3.34	72	0.452	0.0146*	34.4
Treviso	3.33	80	0.052	0.0003*	32.9
Aratai	3.44	68	0.010*	0.0004*	44.5

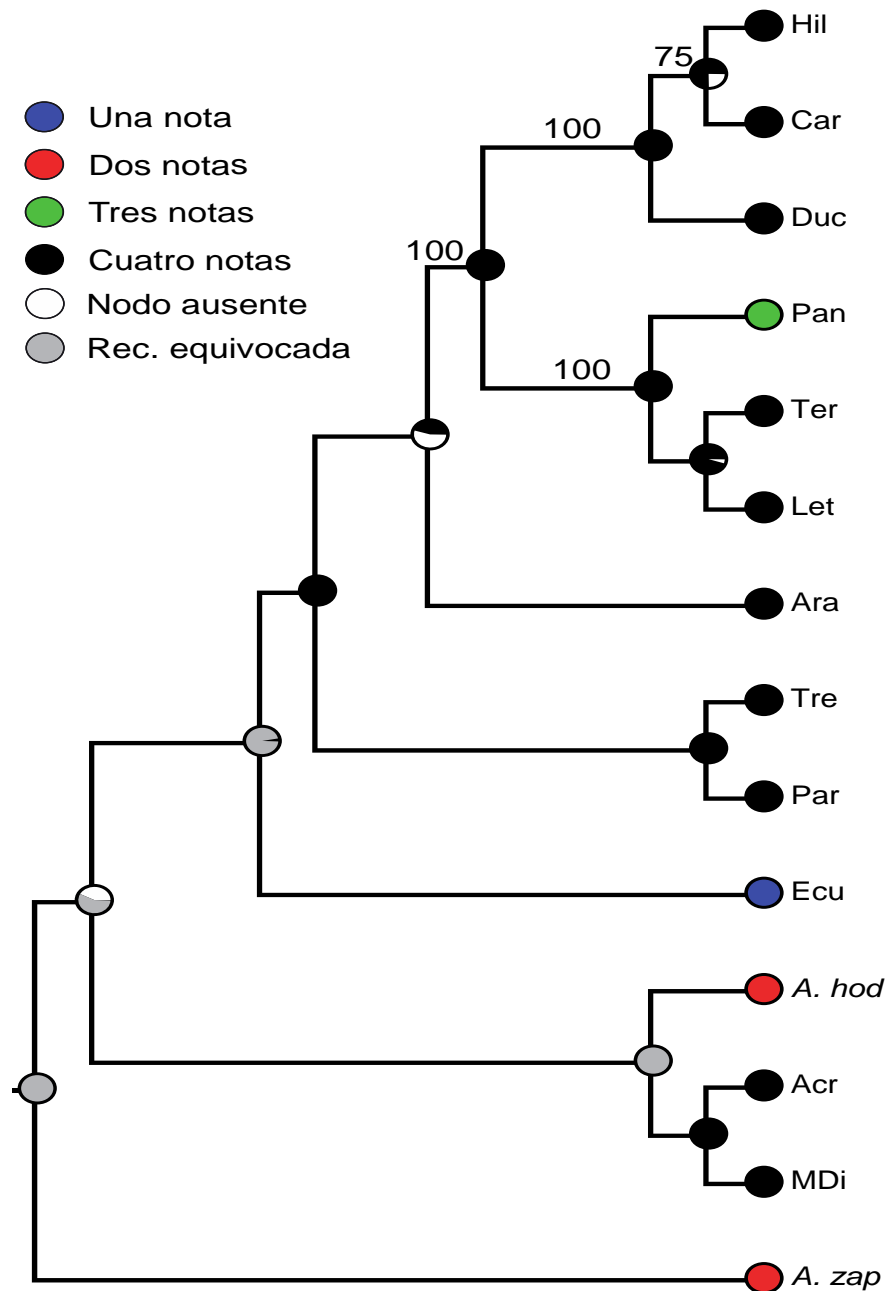
Tabla 2: Resumen de los cambios en el carácter número de notas sobre 15.000 árboles muestreados de la distribución posterior obtenida en el análisis bayesiano, indicando el tipo de cambio, el promedio, el mínimo y el máximo número de veces que ha cambiado el estado del carácter y el porcentaje de árboles en los que se dio el cambio.

Cambio	min	max	Promedio	% de árboles
1->2	0	1	0,028	3
1->4	0	1	0,235	23
2->1	0	1	0,415	41
2->4	0	2	1,206	78
4->1	0	1	0,557	55
4->2	0	2	0,559	34
4->3	1	1	1,000	100

ANEXOS

Anexo 1: Reconstrucción de caracteres ancestrales para el número de notas presentes en los cantos de advertencia del complejo *A. femoralis*, realizado bajo el criterio de ML y el modelo MK1. Incorporamos la incertidumbre filogenética con 15.000 árboles muestreados de la distribución posterior obtenida en el análisis bayesiano. La representación gráfica se realizó bajo el árbol de máxima credibilidad. Los valores asociados a cada nodo indican la probabilidad posterior. El área de

los círculos en los nodos indica el soporte relativo para diferentes estados ancestrales y los colores indican el número de notas en el canto de advertencia, azul una nota, rojo dos notas, verde tres notas y negro cuatro notas. El color blanco indica la proporción de árboles en los que el nodo estuvo ausente y el color gris indica la probabilidad relativa de inconsistencia en la reconstrucción del estado ancestral para un determinado nodo de acuerdo a todos los árboles. Los nombres en las puntas de las ramas se refieren a *Allobates zaparo* (A.zap), *A. hodli* (A.hod). Acre (Acr), Madre de Dios (MDi), Ecuador (Ecu), Pará (Par), Treviso (Tre), Arataï (Ara), Panguana (Pan), Terra Típica (Ter), Leticia (Let), Ducke (Duc), Careiro (Car) e Hiléia (Hil) corresponden a poblaciones de *A. femoralis*.



Anexo 2: Muestras utilizadas para el análisis filogenético indicando información sobre códigos en GenBank, la identificación usada en el análisis, localidad, fuente de información y número de notas. En los casos donde no existe código de GenBank se representó como el ID usado en este estudio.

Cyt b N_Genbank	ID	Localidad	Fuente	No. Notas
HQ290531	Ecuador	Ecuador: Francisco de Orellana, Parque Nacional Yasuni- Estación PUCE	Santos & Cannatella, 2011	1
DQ502661	Ecuador	Ecuador: Sucumbíos, Estación Científica de Universidad Católica cerca de Reserva Faunística Cuyabeno	Grant et al., 2006	1
DQ502525	Ecuador	Ecuador: Sucumbíos, Estación Científica de Universidad Católica cerca de Reserva Faunística Cuyabeno	Grant et al., 2006	1
DQ502526	Ecuador	Ecuador: Sucumbíos, Estación Científica de Universidad Católica cerca de Reserva Faunística Cuyabeno	Grant et al., 2006	1
DQ502664	Acre	Brasil: Acre, Porto Walter	Grant et al., 2006	4
DQ502524	Acre	Brasil: Acre, Porto Walter	Grant et al., 2006	4
DQ502523	Acre	Brasil: Acre, Porto Walter	Grant et al., 2006	4
DQ502549	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Grant et al., 2006	3
fmPAN1	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN11	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN12	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN13	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN5	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN7	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN8	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
fmPAN9	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Llullapichis, Panguana	Amézquita et al., 2009	3
DQ502654	Pará	Brasil: Para, 101 km al sur y 15 km al oriente de Santarem	Grant et al., 2006	4
DQ502522	Pará	Brasil: Para, 101 km al sur y 15 km al oriente de Santarem	Grant et al., 2006	4
DQ502521	Pará	Brasil: Para, 101 km al sur y 15 km al oriente de Santarem	Grant et al., 2006	4
DQ502545	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Grant et al., 2006	4
fmDUC12	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Amézquita et al., 2009	4
fmDUC21	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Amézquita et al., 2009	4
fmDUC23	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Amézquita et al., 2009	4

fmDUC71	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Amézquita et al., 2009	4
fmDUC73	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Amézquita et al., 2009	4
fmDUC74	Ducke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Amézquita et al., 2009	4
DQ502440	Madre Dios	Perú: Madre de Dios, Cusco Amazónico, 15 km al oriente de Puerto Maldonado	Grant et al., 2006	4
DQ502439	Madre Dios	Perú: Madre de Dios, Cusco Amazónico, 15 km al oriente de Puerto Maldonado	Grant et al., 2006	4
DQ502415	Madre Dios	Perú: Madre de Dios, Cusco Amazónico, 15 km al oriente de Puerto Maldonado	Grant et al., 2006	4
femoterra23	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra67	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra68	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra69	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra70	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra71	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra72	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
femoterra73	Terra Típica	Localidad típica: Perú, Loreto, Yurimaguas, Shucshuyacu, Rio Huallaga	Este estudio	4
fmART12	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART13	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART14	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART15	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART16	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART17	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART19	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART3	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART4	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART5	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART6	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART8	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmART9	Arataï	Guyana Francesa, Arataï	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR06	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR10	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR12	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4

fmCAR17	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR19	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR2	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR21	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR28	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR3	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR5	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR65	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR77	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCAR97	Careiro	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Amézquita et al., 2009	4
fmCTB13	Catuaba- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Acre, Rio Branco, Catuaba	Amézquita et al., 2009	2
fmCTB14	Catuaba- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Acre, Rio Branco, Catuaba	Amézquita et al., 2009	2
fmCTB15	Catuaba- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Acre, Rio Branco, Catuaba	Amézquita et al., 2009	2
fmCTB4	Catuaba- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Acre, Rio Branco, Catuaba	Amézquita et al., 2009	2
fmCTB9	Catuaba- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Acre, Rio Branco, Catuaba	Amézquita et al., 2009	2
fmHIL07	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL13	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL15	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL30	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL4	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL43	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL44	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL46	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmHIL8	Hiléia	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Hiléia	Amézquita et al., 2009	4
fmLET12	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Km. 11, Reserva Privada Cercaviva	Amézquita et al., 2009	4
fmLET14	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Km. 11, Reserva Privada Cercaviva	Amézquita et al., 2009	4
fmLET32	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Km. 11, Reserva Privada Cercaviva	Amézquita et al., 2009	4
fmLET35	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Km. 11, Reserva Privada Cercaviva	Amézquita et al., 2009	4
fmLET45	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Km. 11, Reserva Privada Cercaviva	Amézquita et al., 2009	4
fmLET56	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Km. 11, Reserva Privada Cercaviva	Amézquita et al., 2009	4
fmTRE1	Treviso	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
fmTRE10	Treviso	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
fmTRE2	Treviso	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4

fmTRE3	Treviso	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
fmTRE5	Treviso	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
fmTRE6	Treviso	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
DQ502455	<i>Allobates zaparo</i>	Ecuador: Pastaza, Coca, 130 km S de Nuevo Golandrina, hacia el occidente por el Rio Curaray	Grant et al., 2006	2
DQ502525	<i>Allobates zaparo</i>	Ecuador: Sucumbíos, Estación Científica de Universidad Católica cerca de Reserva Faunística Cuyabeno	Grant et al., 2006	2
16s N_Genbank	ID	Localidad	Fuente	N_notes
GU017423	Abunã2189- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Rondônia, Fortaleza do Abunã	Simões et al., 2010	2
Abunã2192	Abunã2192- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Rondônia, Fortaleza do Abunã	Simões et al., 2010	2
Abunã2194	Abunã2194- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Rondônia, Fortaleza do Abunã	Simões et al., 2010	2
Abunã2195	Abunã2195- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Rondônia, Fortaleza do Abunã	Simões et al., 2010	2
Abunã2196	Abunã2196- <i>Allobates hodli</i>	Brasil, Rondônia, Fortaleza do Abunã	Simões et al., 2010	2
Careiro12701	Careiro12701	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12702	Careiro12702	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12703	Careiro12703	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12704	Careiro12704	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12705	Careiro12705	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12706	Careiro12706	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12707	Careiro12707	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro12708	Careiro12708	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro13117	Careiro13117	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro13119	Careiro13119	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro13120	Careiro13120	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
Careiro13121	Careiro13121	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4

Careiro13122	Careiro13122	Brasil, Estado de Amazonas, Manaus, Careiro	Simões et al., 2010	4
DQ502092	PortoWalter3-Acre	Brasil: Acre, Porto Walter	Grant et al. 2006	4
DQ502231	PortoWalter5-Acre	Brasil: Acre, Porto Walter	Grant et al., 2006	4
EU342532	PortoWalter4-Acre	Brasil: Acre, Porto Walter	Grant et al., 2006	4
AF128572	Ecuador	Ecuador, Sucumbíos, Cuyabeno	Clough & Summers, 2000	1
DQ502093	Ecuador	Ecuador, Sucumbíos, Cuyabeno	Grant et al., 2006	1
DQ502094	Ecuador	Cuyabeno, Sucumbíos, Ecuador	Grant et al., 2006	1
EU342534	Ecuador	Ecuador: Sucumbíos: Laguna Grande, Reserva de Producción Faunística Cuyabeno	Santos et al., 2009	1
EU342536	Leticia	Colombia, Amazonas, Leticia, Cerca Viva	Santos et al., 2009	4
DQ501990	MadreDeDios1	Perú, Cusco Amazónico, Puerto Maldonado	Grant et al., 2006	4
DQ502014	MadreDeDios2	Perú, Cusco Amazónico, Puerto Maldonado	Grant et al., 2006	4
DQ502015	MadreDeDios3	Perú, Cusco Amazónico, Puerto Maldonado	Grant et al., 2006	4
DQ502117	Panguana	Perú: Huanuco, Rio Lullapichis, Panguana	Grant et al., 2006	3
DQ502113	ReservaDucke	Brasil: Amazonas, Reserva Florestal Adolfo Ducke	Grant et al., 2006	4
GU017477	Trairao12284	Brasil, Pará, Trairão	Simões et al., 2010	4
GU017478	Trairao12285	Brasil, Pará, Trairão	Simões et al., 2010	4
Trairao12290	Trairao12290	Brasil, Pará, Trairão	Simões et al., 2010	4
GU017474	Treviso12266	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
Treviso12268	Treviso12268	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
Treviso12269	Treviso12269	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
GU017475	Treviso12270	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
Treviso12296	Treviso12296	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
Treviso12300	Treviso12300	Brasil, Estado de Pará, Fazenda Treviso	Amézquita et al., 2009	4
EU342536	Leticia	Amazonas, Leticia, Cerca Viva	Santos et al., 2009	4
AY364578	<i>Allobates zaparo</i>	Ecuador	Santos et al., 2003	-
EU342530	<i>Allobates zaparo</i>	Ecuador: Pastaza: Kapawi Lodge	Santos et al., 2009	-