

**DIVERSIDAD CRÍPTICA EN LOS ANDES: CLARIFICANDO LA RIQUEZA GENÉTICA,
VARIABILIDAD ACÚSTICA Y MORFOLÓGICA DE *PRISTIMANTIS PAISA* (ANURA:
CRAUGASTORIDAE)**

Khristian Venegas-Valencia

Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo

Asesor: Mauricio Rivera-Correa

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

El Carmen de Viboral, Colombia

2021

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Área de estudio.....	6
Análisis acústico.....	8
Análisis Morfométrico.....	8
Análisis estadísticos.....	9
Laboratorio molecular.....	9
Análisis filogenético.....	10
Distancia genética.....	10
RESULTADOS	11
Análisis acústico.....	11
Análisis morfométrico.....	18
Análisis filogenético.....	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	32
CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	32
AGRADECIMIENTOS	33
REFERENCIAS	34
TABLAS	42
ANEXOS	46

RESUMEN

La bioacústica, la filogenética y la morfología son consideradas herramientas útiles para resolver hipótesis de delimitación de especies, debido al amplio conjunto de caracteres informativos que estas fuentes de evidencia proveen. *Pristimantis* es un género con una gran cantidad de especies morfológicamente crípticas que se están descubriendo gracias al uso de varias líneas de evidencia. Aquí integramos evidencia bioacústica, molecular y morfométrica para evaluar y delimitar la especie *Pristimantis paisa*, una rana de lluvia de alta montaña con una taxonomía confusa y posición filogenética desconocida en la actualidad. Los análisis revelaron un escenario más diverso de lo previamente sospechado y con ello la existencia de cinco entidades evolutivas morfológicamente crípticas que han sido tratadas bajo el nombre de *P. paisa*. y que fueron corroboradas por evidencia acústica y cuatro de ellas por inferencia genética y filogenética. Además, pudimos establecer a partir de nuestra estructura filogenética a cuál de los clados pertenece *P. paisa* ya que obtuvimos información de la localidad tipo. Los caracteres más efectivos para discriminar entre estas entidades fueron los cantos de anuncio y las secuencias de ADN, tanto que las diferencias morfométricas y morfológicas no fueron tan decisivas. Se proporciona por primera vez la descripción del canto de anuncio de *P. paisa*, la primera hipótesis formal de la posición filogenética y relaciones filogenéticas de la especie y herramientas prácticas para el reconocimiento de los diferentes patrones morfológicos que presenta la especie en contraste a la pobre información morfológica proporcionada en su descripción original. Nuestros resultados sugieren que la riqueza de especies de *Pristimantis* en los Andes se encuentra subestimada y resaltan la importancia de integrar diferentes líneas de evidencia para resolver problemas taxonómicos en linajes crípticos dentro de un grupo de ranas altamente diverso y taxonómicamente complejo.

Palabras clave: *Pristimantis paisa*, análisis integrativo, canto de anuncio, patrones morfológicos, relaciones filogenéticas.

INTRODUCCIÓN

La diversidad críptica es definida como la asignación de dos o más especies distintas bajo un mismo nombre (Bickford *et al.* 2006), es decir, que han sido identificadas como una única especie. Estas constituyen un importante desafío taxonómico debido a que, en la mayoría de los casos, se subestima la real diversidad de especies y el número de entidades contenidas bajo su taxonomía. Para facilitar la detección de estas especies, en la actualidad, se emplean diferentes herramientas científicas, tales como la bioacústica y la genética (Padial *et al.* 2010; Katz *et al.* 2015) adicional a la morfología tradicional, que constituyen criterios operacionales para la delimitación de entidades evolutivas independientes.

La bioacústica, disciplina que evalúa los sonidos de la naturaleza, se constituye en una herramienta útil para estudios taxonómicos (Padial *et al.* 2008; Köhler *et al.* 2017) ya que los caracteres fenotípicos obtenidos de estos son frecuentemente evidencia cualitativa y cuantitativa, en particular en anfibios anuros, los cuales en su mayoría emiten sonidos o vocalizaciones. En ese sentido, las vocalizaciones han sido utilizadas para establecer límites de especies (Köhler y Lötters, 1999; Köhler, 2000; Reichle *et al.* 2001; Köhler *et al.* 2017; Hepp y Pombal, 2019) al considerarse mecanismos de aislamiento precigótico (Duellman y Pyles, 1983), por lo que análisis comparativos de estos atributos pueden contribuir al entendimiento de la complejidad de anuros crípticos (Heyer *et al.* 1996; Wycherley *et al.* 2002; Angulo *et al.* 2003; Gergus *et al.* 2004; Padial *et al.* 2008; Glaw *et al.* 2010).

En años recientes, la evaluación de la diversidad genética entre especies, ha cobrado interés para valorar la magnitud de la variabilidad y el impacto en la comprensión de los límites de especies en anuros (Vences *et al.* 2005a; Vences *et al.* 2005b; Fouquet *et al.* 2007; Rivera-Correa y Daza 2016; Rivera-Correa *et al.* 2017; Ron *et al.* 2018) y ha sido empleada en análisis integradores útiles en la identificación de especies crípticas (Fouquet *et al.* 2016; Peloso *et al.* 2018). Sumado a esto, para algunas especies existen limitaciones operacionales de distinción morfológica entre especies, por carencia de atributos distintivos discretos, lo cual no siempre es proporcional a su diferenciación genética (e.g., Chek *et al.*

2001). En tales casos, la morfología debe ser valorada en conjunto con otras fuentes de evidencia para el reconocimiento de entidades distintas.

Pristimantis (Jiménez de la Espada, 1870) es el género de anuros con mayor diversidad en el Neotrópico (ver AmphibiaWeb 2021; Frost, 2021). Actualmente se reconocen 569 especies, cerca del 85%, se encuentra en los ecosistemas andinos (Frost, 2021) y de las cuales 230 especies se distribuyen en Colombia (Acosta-Galvis, 2021). A pesar de esfuerzos históricos en el conocimiento del género (e.g. Lynch y Duellman 1997; Duellman y Lehr, 2009), este aún continúa siendo ampliamente documentado a nivel taxonómico (Hedges *et al.* 2008; Padial *et al.* 2008; Padial y De la Riva, 2009), es así como de las 1570 especies descritas en la última década (AmphibiaWeb 2021), el 8% pertenece al género *Pristimantis*.

A pesar de su gran diversidad, *Pristimantis* ha sido tradicionalmente un género confuso desde el punto de vista taxonómico (ver Crawford y Smith 2005; Elmer *et al.* 2007; Padial y De la Riva, 2009; Crawford *et al.* 2010; García *et al.* 2012; Ortega Andrade *et al.* 2015). Algunas especies del género presentan atributos crípticos, es decir, sutiles diferencias morfológicas interespecíficas, las cuales dificultan la detección de los caracteres diagnósticos y por tanto establecer los límites de las especies (ver Bickford, 2006; Padial *et al.* 2010). Sumado a ello, algunos *Pristimantis* exhiben altos niveles de polimorfismo intraespecífico (Lynch, 1992; Navarro-Salcedo *et al.* 2019), complejizando la naturaleza de la variación, motivo por el cual, el uso de análisis morfológicos como única línea de evidencia, en muchos casos, es limitado.

En esos casos, la implementación de herramientas y análisis integradores (Dayrat 2005; Padial *et al.* 2010), tales como la evaluación molecular para determinar la posición filogenética de la especie y la magnitud de la variación genética y/o los análisis bioacústicos, son cada vez más frecuentes (e.g., Crawford y Smith, 2005; Elmer y Cannatella, 2008; Padial *et al.* 2008; Brown *et al.* 2009; Ron *et al.*

2018; Rivera-Correa y Daza, 2020), y han contribuido a evaluar la taxonomía en complejos de especies o especies crípticas (Camargo *et al.* 2006; Funk *et al.* 2011).

Pristimantis paisa (Lynch y Ardila-Robayo, 1999; Fig. 1) es una especie endémica de Colombia con una distribución restringida al norte de la cordillera Central en el departamento de Antioquia, en altitudes que van desde los 1800 hasta los 3100 m.s.n.m. (Palacio *et al.* 2006; Frost, 2020). Esta especie fue descrita a partir de 18 ejemplares provenientes de cuatro localidades: Cerro Padre Amaya, municipio de Medellín; Serranía Las Baldías, municipio de Bello; Alto de San Miguel, municipio de Caldas y Veredas San Francisco y La Sirigua, municipio de Sonsón. La descripción de la especie es ajustada a las usuales descripciones en el género, pero presentó algunas limitaciones por ejemplo: (1) La diagnosis resultó de la combinación de 14 estados de carácter, pero sin un atributo morfológico diagnóstico único claramente diferenciable de las otras especies congénéricas; (2) la descripción no presentó una diagnosis comparativa con especies hipotéticamente emparentadas, excepto por la presentación de un tabla de medidas morfométricas y (3) la única fuente de evidencia descriptiva, como fue la tradición en el momento de la descripción, fue la morfología (Fig. 1). Estos factores, en parte, han conducido a que muchos individuos del género *Pristimantis* colectados en tierras altas de la cordillera Central en Antioquia, que se ajusten a los atributos descritos de la publicación original sean asignadas a esta especie (ver base de datos del Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia, MHUA) generando en muchos casos incertidumbre taxonómica.

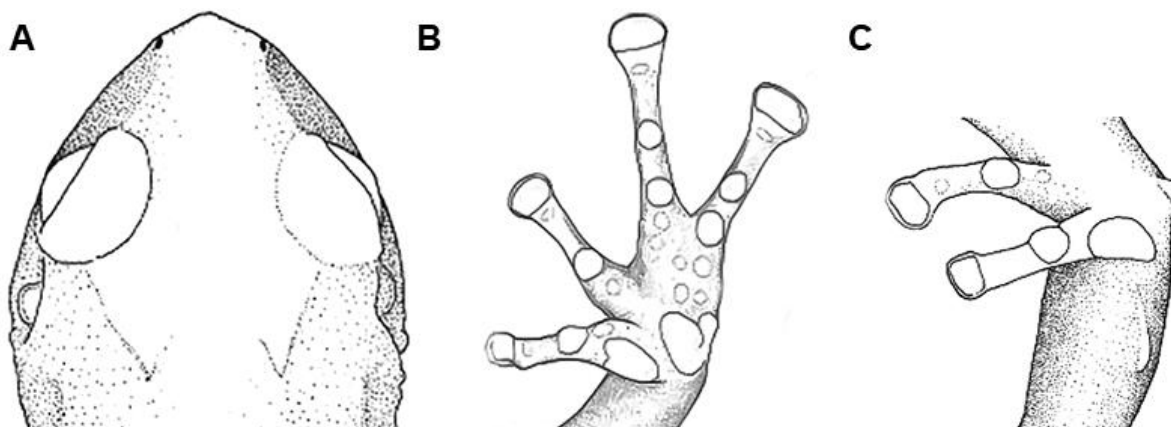


Figura 1. Representación morfológica de *Pristimantis paisa* propuesta en la descripción original de la especie A) Vista dorsal de la cabeza. B) Vista palmar de la mano. C) Vista ventral de la pata y el tarso. Modificado de Lynch y Ardila-Robayo (1999).

Adicionalmente, la posición taxonómica de *Pristimantis paisa* ha sido relativamente inestable, siendo posicionada entre diferentes agrupaciones al interior del género; Lynch y Ardila-Robayo (1999) asignaron a *P. paisa* dentro del complejo *P. taeniatus*, a pesar de que este complejo no fue formalmente definido. Posteriormente, Hedges *et al.* (2008) la asignan al grupo de especies *P. frater* sin incluirla en los análisis filogenéticos, mientras que Pinto *et al.* (2012) proponen a *P. paisa* como especie hermana de *P. erythropleura* con base en evidencia molecular a partir de los voucher: MHUA 4811 (ACJ 1344) y ANDES 0466 (EMM 247). Siguiendo estos resultados, Padial *et al.* (2014) la asignan al grupo *P. ridens* sin comentarios adicionales. Posteriormente, los voucher usados por Pinto *et al.* (2012) fueron identificados y reasignados a *P. penelopus* (Restrepo *et al.* 2017). Por lo tanto *P. paisa* nunca ha sido formalmente incluida en un análisis filogenético, indicando que su actual posición filogenética al interior del género *Pristimantis* aún es desconocida.

Teniendo en cuenta lo anterior, atributos de la historia evolutiva de *P. paisa*, ampliamente importantes en la comprensión de las diferencias intra e interespecíficas, como las vocalizaciones, morfometría y diversidad genética, no han sido evaluados ni descritos para la especie. Por lo tanto, documentar estos atributos evolutivos en diferentes poblaciones donde se ha sugerido la presencia de *P. paisa* permitirán obtener información sólida para comprender la taxonomía de este linaje. Dado esto, esta investigación se trazó como objetivo integrar evidencia acústica, morfométrica y filogenética en *P. paisa* para establecer el nivel de variación y su delimitación taxonómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los sitios de muestreo evaluados en este estudio comprenden ocho municipios donde la especie ha sido registrada previamente en las subregiones Norte, Oriente y Valle de Aburrá, Antioquia, Colombia (base de datos MHUA; Fig. 2, Tabla 1): Medellín (Localidad tipo, Subregión Valle de Aburrá), El Retiro, Rionegro, El Carmen de Viboral, La Unión y Sonsón (Subregión Oriente), Santa Rosa de Osos y Valdivia (Subregión Norte). Registramos las localidades, coordenadas y elevaciones utilizando un GPS Garmin 60Cx, georreferencias validadas en GoogleEarth. Se colectaron 66 individuos y fueron sacrificados con lidocaína al 2%, fijados en etanol al 80% y almacenados en etanol al 70%. Antes de la fijación, se extrajo tejido de las extremidades posteriores de algunas muestras y se conservaron en etanol al 95% para los estudios genéticos.

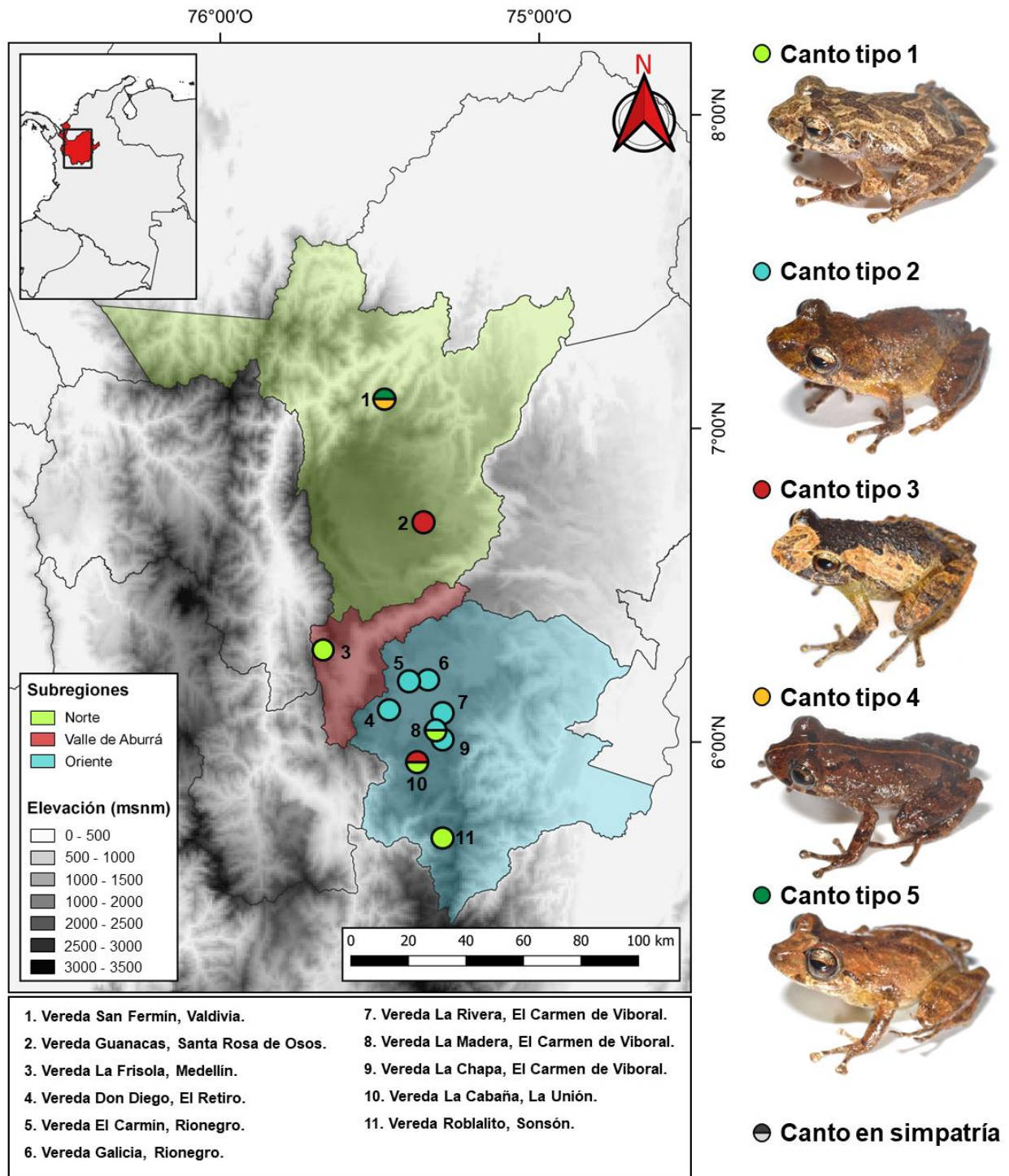


Figura 2. Mapa del área de estudio que indica la posición geográfica de las 11 localidades de *Pristimantis paisa* muestreadas en las subregiones Norte, Valle de Aburrá y Oriente del departamento de Antioquia, en el norte de la Cordillera Central de Colombia. Fotografías: MRC.

Análisis acústico

Las grabaciones se realizaron con dos grabadoras digitales, TASCAM DR-40 y TASCAM DR-22WL, esta última unida a un micrófono unidireccional SENNHEISER ME66/K6 con una frecuencia de muestreo de 44.1 kHz y 16 bits de resolución. Se colectó y analizó un total de 566 cantos correspondientes a 48 individuos (25 especímenes colectados) registrados en 11 localidades. Las variables espectrales y temporales de los cantos se calcularon en el software Raven Pro1.6 (Bioacoustics Research Program, 2014). Los espectrogramas fueron construidos con una ventana de Hann al 90% de solapamiento 256 puntos de resolución para la transformación rápida de Fourier (FFT). Se midieron los siguientes parámetros acústicos, siguiendo recomendaciones de Köhler *et al.* (2017): (1) duración del canto (s), (2) frecuencia dominante (kHz), (3) número de notas (n notas / canto), (4) frecuencia de cada nota (kHz), (5) número de armónicos (n armónicos / nota), (6) frecuencia de cada armónico (kHz), (7) intervalo entre notas (s), (8) ancho de banda (BW 90%), (9) tasa de canto (n cantos / min) y finalmente, (10) frecuencia 5% (kHz) y (11) frecuencia 95% (kHz), que incluyen la frecuencia más baja y la frecuencia más alta, ignorando 5% por encima y por debajo de la banda de frecuencia formada por la distribución de energía. Los espectrogramas y oscilogramas se generaron utilizando el paquete Seewave v 2.1.3 (Sueur *et al.* 2019) en la versión R 3.6.0 (R Core Team, 2019) Los valores son representados como media \pm desviación estándar seguido del rango (mínimo-máximo).

Análisis Morfométrico

Se midieron 50 individuos machos y 16 hembras de las 11 localidades, que fueron colectados y asignados temporalmente bajo el número de campo (MRC; Mauricio Rivera-Correa) y serán depositados posteriormente en la colección del Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia (MHUA). Los caracteres diagnósticos de la especie se basaron en la descripción realizada por Lynch y Ardila-Robayo (1999) y se midieron 18 variables morfométricas seleccionadas siguiendo a Rivera-Correa y Daza (2016), haciendo uso de un calibrador digital Mitutoyo CD-6''CSX. Estas medidas corresponden a: (1) longitud

rostro-cloaca (LRC); (2) ancho de la cabeza (AC); (3) longitud de la cabeza (LC); (4) diámetro del ojo (DO); (5) distancia ojo-narina (DON); (6) distancia narina-rostro (DNR); (7) distancia internarinal (DIN); (8) distancia interocular (DIO); (9) diámetro del tímpano (DT); (10) longitud del antebrazo (LAB); (11) ancho del antebrazo (AAB); (12) longitud de la mano (LM); (13) longitud del fémur/muslo (LFM); (14) longitud de la tibia (LT); (15) longitud del tarso (LTA); (16) longitud de la pata (LP); (17) ancho del disco del dedo III de la mano (ADIII); (18) ancho del disco del dedo IV del pie (ADIV).

Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas univariadas tanto para las variables acústicas como para las variables morfométricas, en las que se evaluó la homogeneidad de varianzas y se aplicó un ANOVA de una vía, con el fin de probar diferencias significativas entre poblaciones, seguido de la prueba post hoc HSD Tukey, que permitiera determinar cuales poblaciones diferían significativamente para cada uno de los parámetros acústicos y medidas morfométricas analizadas. Posteriormente, se realizaron pruebas multivariadas para determinar si los parámetros acústicos y medidas morfométricas podrían usarse potencialmente para discriminar entre poblaciones (Simões *et al.* 2008; Padial y De La Riva, 2009; Gambale *et al.* 2014), reduciendo la dimensionalidad de los valores medios de los 11 parámetros acústicos y 18 morfométricos, mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP). Posteriormente se incluyeron los puntajes generados para cada factor como variables independientes para un análisis de función discriminante (AFD), eliminando posibles autocorrelaciones entre las variables. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R versión 3.6.0 (R Core Team 2019).

Laboratorio molecular

Se evaluaron dos fragmentos de genes mitocondriales (COI y 16S) de 45 especímenes, 41 de ellos pertenecientes a priori a *Pristimantis paisa*. El ADN genómico total fue extraído de tejidos conservados en etanol utilizando el kit de purificación de ADN genómico GeneJET (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Se amplificó un fragmento del gen ribosómico 16S usando los cebadores 16SCL-16SDH (Santos *et al.* 2003) y un fragmento de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa usando los cebadores dgLCO y dgHCO (Folmer *et al.* 1994). Se enviaron los productos de PCR purificados a Macrogen (Macrogen, Inc., Corea) para su secuenciación. Se verificaron y editaron los cromatogramas manualmente usando Geneious 9.1.8 (creado por Biomatters y disponible en <http://www.geneious.com>).

Análisis filogenético

Se usaron algunas de las terminales empleadas por Rivera-Correa y Daza (2020) para construir el conjunto de datos moleculares, agregando representantes filogenéticamente cercanos a *Pristimantis paisa* según los resultados preliminares al realizar un alineamiento por similitud usando BLAST (Tabla S4). La matriz incluyó 132 terminales que representan 40 especies nominales dentro de *Pristimantis* y se empleó *Craugastor metriosistus* como grupo externo (Apéndice 1). El conjunto de datos completo incluyó 1476 pares de bases alineadas: 846 pb de 16S y 630 de COI, utilizando el método G-INS-i en MAFFT v7 (Kato y Standley 2013). Se establecieron cuatro particiones (16S, COIpos1, COIpos2, COIpos3) y se infirió el mejor esquema de partición y modelo de evolución para cada partición utilizando ModelFinder bajo el criterio BIC (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017), los cuales fueron, 16S: TIM2 + F + R6, COIpos1: TIM3e + G4, COIpos2: TPM3 + F + R2 y COIpos3: TPM3 + F + R2. El árbol filogenético se infirió usando máxima verosimilitud en IQTREE (Nguyen *et al.* 2015) y los soportes de las ramas se estimaron a partir de 10000 pseudo-replicas utilizando el enfoque ultrarrápido Bootstrap (Hoang *et al.* 2018).

Distancia genética

Se calcularon las distancias genéticas (DG) sin corregir entre *Pristimantis paisa* y las especies más estrechamente relacionadas de acuerdo a la inferencia filogenética utilizando el software MEGA 7 (Tamura *et al.* 2013), a partir de la comparación de 630 pb del marcador COI que tuvo mayor

disponibilidad en el conjunto de datos. Para las distancias genéticas significativas entre linajes, en caso de monofilia recíproca se consideró un umbral de 7,5% para COI (Lyra *et al.* 2017), para una eventual asignación a especies candidatas.

Consideraciones éticas

Este proyecto contó con la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) y se ajustó a la regulación normativa de recolección y almacenamiento de especímenes de especies silvestres con fines de investigación científica, amparado en los decretos de 1375 y 1376 del 27 de junio de 2013 y expedidos por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Adicionalmente todo el material fue depositado en el Museo de Herpetología Universidad de Antioquia, colección de referencia avalado por el Instituto Humboldt con el código 080.

RESULTADOS

Análisis acústico

En términos generales, los cantos de cada población evaluada consistieron en cantos de series tonales, constituidos por 4 a 29 notas en promedio. Algunas poblaciones registraron una, dos y tres notas. Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) mostró que existen diferencias significativas entre los cantos de las poblaciones, para cada una de las variables temporales y espectrales (Tabla 2, Fig. 4A–D), las cuales permitieron discriminar entre las vocalizaciones e identificar cinco tipos de cantos diferentes (Fig. 3A–E). La prueba post hoc de Tuckey HSD estableció diferencias en cada uno de los atributos evaluados, que permitió determinar la notable diferencia entre las variables analizadas para cada uno de los tipos de canto (Tabla S2). Los cinco tipos de canto son descritos a continuación:

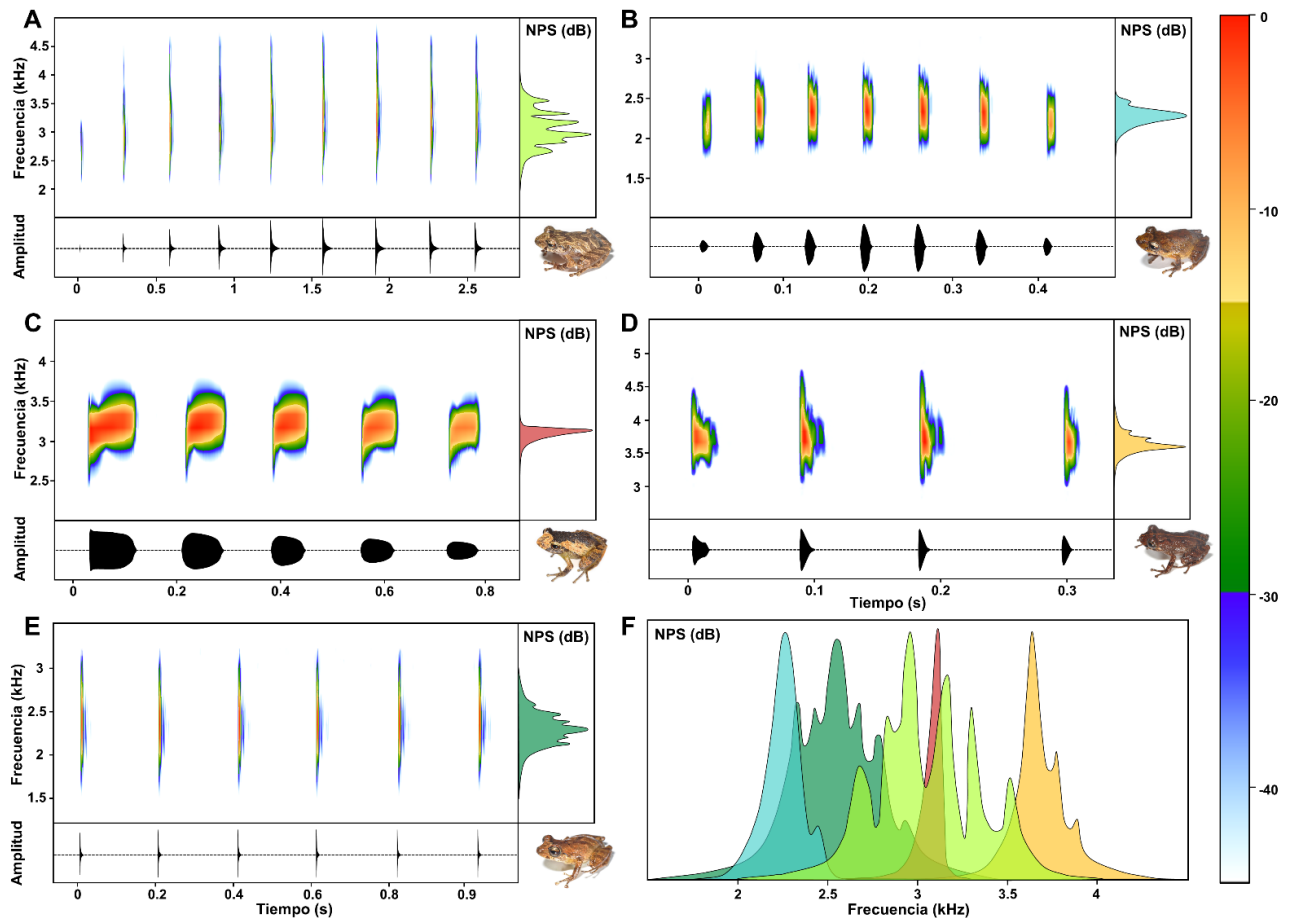


Figura 3. Representación de los cinco tipos de canto de anuncio caracterizados en las diferentes poblaciones analizadas de *Pristimantis paisa*. A) Canto tipo 1 (MRC1779, LRC 20.08 mm, color verde claro). B) Canto tipo 2 (MRC1777, LRC 19.37 mm, color azul). C) Canto tipo 3 (MRC1240, LRC 16.28 mm, color rojo). D) Canto tipo 4 (MRC1851, LRC 18.26 mm, color naranja). D) Canto tipo 5 (MRC1961, LRC 21.06 mm, color verde oscuro). F) Espectros de poder superpuestos de los cinco tipos de canto.

Canto tipo 1: Se analizó un total de 113 cantos correspondientes a 16 individuos provenientes de cuatro de las poblaciones estudiadas (Vereda La Frisola, Medellín; Vereda La Madera, El Carmen de Viboral; Vereda La Cabaña, La Unión; Vereda Roblalito, Sonsón; Fig. 2). El canto consistió en una serie tonal que comprende de 8 a 15 notas cortas (Fig. 3A) que podían llegar a presentar hasta cuatro bandas armónicas cada una (Tabla 2). La duración del canto fue de $4,039 \pm 0,470$ (3,504–4,982) s, siendo el canto con mayor duración de los cinco tipos, con notas de $0,007 \pm 0,001$ (0,005–0,010) s, separadas por intervalos silenciosos de $0,380 \pm 0,073$ (0,280–0,499) s. La frecuencia dominante del canto fue de 2,886

$\pm 0,168$ (2,347–3,087) kHz sin modulación aparente. El espectro de poder muestra varios picos, estando el punto de mayor energía del canto cerca a los 3 kHz (Fig. 3F). En términos cualitativos, la amplitud de cada nota tiene un incremento al inicio, el cual disminuye abruptamente hasta terminar en un pequeño pico (Fig. 3A).

Historia natural: Se encontraron individuos vocalizando a una altura media del suelo de 0,2 a 1 m sobre las ramas y hojas de helecho, pastos y vegetación arbustiva baja cercana a bordes de camino y áreas abiertas con alto grado de intervención antrópica, principalmente para uso agrícola y servidumbres. Dos de las poblaciones en las que registramos este tipo de canto fueron simpátricas con otro tipo de canto diferente, una de ellas fue en la vereda La Madera (El Carmen de Viboral; Fig. 2), en la que se registró junto con individuos con canto tipo 2, ambas poblaciones acústicas con un pico de actividad compartido entre las 17:00 y las 19:00 horas. La otra población simpátrica fue en la vereda La Cabaña (La Unión; Fig. 2), en la que también se encontraron individuos con canto tipo 3, en este caso, con una repartición de la actividad acústica marcada, en la que los individuos con canto tipo 1 iniciaban su actividad por un periodo de tiempo de 2 horas, inmediatamente después de que los individuos con canto tipo 3 cesaran sus vocalizaciones (15 min después, aprox), alrededor de las 19:00 horas.

Canto tipo 2: La descripción se realizó a partir de 164 cantos correspondientes a 13 individuos provenientes de cuatro de las poblaciones (Veredas El Carmín y Galicia, Rionegro; Veredas La Madera y La Rivera, El Carmen de Viboral; Fig. 2). Este canto comprende de una serie de 5 a 23 notas (Fig. 3B), cada una de ellas con una duración media de $0,020 \pm 0,005$ (0,012–0,028) s, separadas por intervalos silenciosos de $0,056 \pm 0,008$ (0,048–0,074) s y cada nota podía presentar un total de hasta cuatro bandas armónicas (Tabla 2). La duración del canto fue de $0,602 \pm 0,269$ (0,362–1,358) s con una frecuencia dominante de $2,360 \pm 0,042$ (2,279–2,412) kHz (Fig. 3F). Adicionalmente, la amplitud de la nota

incrementa moderadamente hacia la mitad de su duración y luego disminuye de manera similar hasta su finalización, adoptando una forma ovalada vertical (Fig. 3B).

Historia natural: Fueron registrados individuos vocalizando entre 0 y 0,6 m del suelo, sobre hojarasca y vegetación baja que crece principalmente en barrancos empinados al borde de caminos y carreteras, y en áreas con alto grado de transformación como jardines y “cercos vivos”, con un periodo de actividad acústica que tiene su pico entre las 17:00 y las 19:00 horas. Una de las poblaciones fue simpátrica con individuos de canto tipo 1 (Vereda La Madera, El Carmen de Viboral; Fig. 3C), con los que compartían el mismo periodo de actividad y un uso de hábitat similar.

Canto tipo 3: Se analizó un total de 75 cantos correspondientes a 5 individuos provenientes de dos de las poblaciones (Vereda Guanacas, Santa Rosa de Osos; Vereda La Cabaña, La Unión; Fig. 2). El canto tuvo una duración media de $0,590 \pm 0,113$ (0,475–0,719) s con una frecuencia dominante de $3,095 \pm 0,104$ (2,934–3,190) kHz (Fig. 3F) y consistió en una serie tonal de 3 a 5 notas (Fig. 3C), siendo el canto con número de notas más conservado entre los cinco tipos. Cada nota presentó una duración media de $0,068 \pm 0,009$ (0,060–0,081) s, separadas por intervalos silenciosos de $0,080 \pm 0,014$ (0,072–0,104) s, presentando hasta cuatro bandas armónicas por nota y siendo las más largas en comparación a la duración de las notas de los demás tipos de canto (Tabla 2). Las notas presentan modulación en la frecuencia, que es menor al inicio e incrementa hacia el final de manera homogénea. La amplitud de la primera nota incrementa abruptamente al inicio y luego disminuye lentamente hacia el final, tomando una forma de campana, mientras que la de las demás notas incrementa de forma convexa y disminuye gradualmente hacia el final tomando una forma ovada horizontal.

Historia natural: Los individuos con este tipo de canto vocalizaban en alturas de 0,2 y 1 m del suelo, al interior de vegetación arbustiva baja bastante enmarañada, característica de terrenos en sucesión o estado de “rastrojo” cercana a bosques secundarios en recuperación o con algún grado de intervención. Una de

sus poblaciones fue simpátrica con individuos de canto tipo 1 (Vereda La Cabaña, La Unión; Fig. 2), mostrando una actividad acústica previa a la actividad de los individuos con canto tipo 1. No se registraron individuos con los dos tipos de canto vocalizando durante el mismo periodo de tiempo.

Canto tipo 4: Fueron analizados 115 cantos correspondientes a 12 individuos provenientes de una de las poblaciones (Vereda San Fermín, Valdivia; Fig. 2). Este canto tuvo una duración de $0,558 \pm 0,424$ ($0,206-1,727$) s, con una frecuencia dominante de $3,587 \pm 0,084$ ($3,402-3,695$) kHz y consistió en una serie tonal de 2 a 29 notas (Fig. 3D), siendo el tipo de canto con mayor número de notas registrado en un solo canto (Tabla 2) y el canto con la frecuencia más alta (Fig. 3F). Cada nota presentó una duración media de $0,014 \pm 0,002$ ($0,009-0,019$) s, separadas por intervalos silenciosos de $0,100 \pm 0,013$ ($0,081-0,119$) s y podía llegar a tener hasta cuatro bandas armónicas por nota (Tabla 2). En términos cualitativos, cada nota presenta una leve modulación de frecuencia, que es mayor al inicio y disminuye brevemente hacia el final de esta y la amplitud de cada nota presenta un aumento repentino al inicio y disminuye homogéneamente a manera de triángulo (Fig. 3D).

Historia natural: Los individuos registrados vocalizaban entre 2 y 5 m del suelo, sobre vegetación arbustiva alta o ramas de árboles cubiertas de musgo, únicamente en el borde de bosques secundarios maduros, con un pico de actividad entre las 17:00 y las 19:00 horas. Esta población fue simpátrica con individuos de canto tipo 5 (Fig. 2), pero su uso de hábitat fue diferente y no se compartía.

Canto tipo 5: Se analizaron 99 cantos correspondientes a 2 individuos provenientes de una de las poblaciones (Vereda San Fermín, Valdivia; Fig. 2). El canto consistió en una serie de 1 a 11 notas (Fig. 3E), siendo 4 notas las más frecuentes, sin embargo, se registró una sola nota por canto en dos ocasiones (Tabla 2), Cada nota presentó una duración media de $0,005 \pm 0,0001$ ($0,005-0,006$) s, separadas por intervalos silenciosos de $0,206 \pm 0,032$ ($0,183-0,229$) s y podían presentar un total de hasta ocho bandas armónicas por nota (Tabla 2), siendo el tipo de canto con mayor número de armónicos de los cinco tipos.

La duración del canto fue de $0,673 \pm 0,328$ ($0,441-0,904$) s, con una frecuencia dominante de $2,399 \pm 0,012$ ($2,391-2,407$) kHz sin modulación aparente (Fig. 3E) y con varios picos de energía, estando el punto de mayor energía cerca de los 2,5 kHz (Fig. 3F). La amplitud de la onda incrementa abruptamente al inicio y disminuye rápidamente hacia el final formando un pequeño pico (Fig. 3E).

Historia natural: Se encontraron individuos con actividad acústica entre las 17:00 y las 19:00 horas, con machos vocalizando sobre vegetación baja u hojarasca en el interior de bosque secundario maduro, entre 0 y 0,5 m del suelo. Esta población fue simpátrica con la población registrada de individuos con canto tipo 4 (Fig. 2), sin embargo, el uso de hábitat es bastante diferente entre estas dos poblaciones, ya que los individuos con canto tipo 5 utilizan exclusivamente vegetación de sotobosque baja y solo se registraron activamente en el interior de bosque, mientras que todos los individuos con canto tipo 4 registrados, se encontraron únicamente sobre la vegetación de borde de bosque y en alturas que superan los 2 m del suelo.

El análisis de componentes principales (ACP) revela una separación entre los cinco tipos de canto, sin ningún tipo de superposición (Fig. 4E). El primer componente (CP1) explicó el 42% de variación, mientras que el segundo componente (CP2) explicó un 37,7%. Para el CP1 la duración del canto, el ancho de banda y la duración del intervalo entre notas fueron las variables que más aportaron a la variación del análisis (Tabla 3). En su lugar, las variables de energía, es decir, la frecuencia dominante la frecuencia mínima y la frecuencia máxima fueron las variables que más aportaron para el segundo componente (Tabla 3). Finalmente, nuestro análisis de función discriminante (AFD) confirmó una separación significativa entre los cinco tipos de canto (Fig. 4F) que fue respaldada por una confiabilidad del 100%.

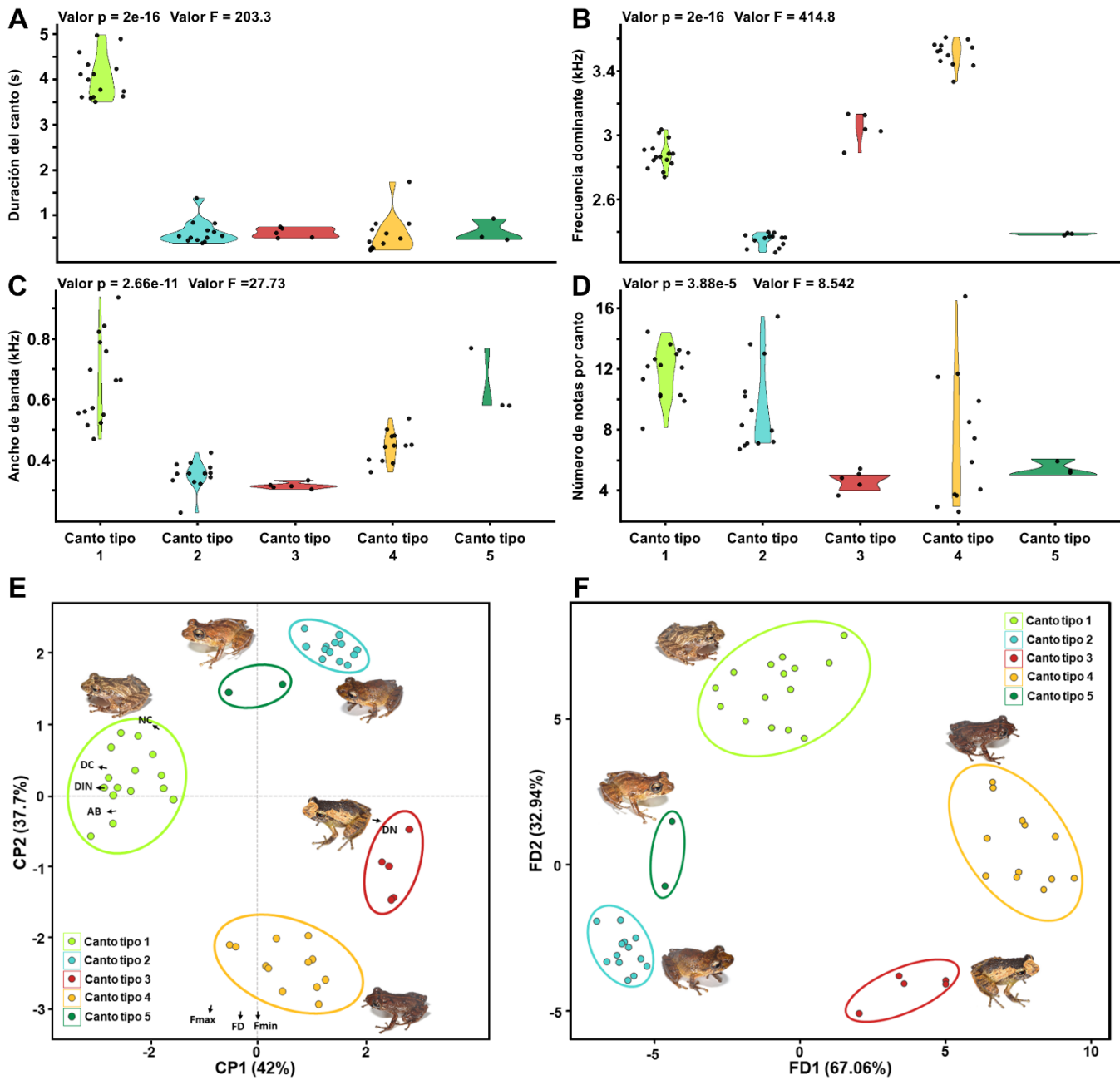


Figura 4. A–D) Diferencias en variables espectrales y temporales del canto de anuncio de *Pristimantis paisa* de diferentes localidades: A) Duración del canto (DC), B) Frecuencia dominante (FD), C) Ancho de banda (AB) y D) Número de notas por canto (NC). E–F) Diferenciación de los cantos de anuncio de *Pristimantis paisa* en cinco grupos de acuerdo con las pruebas multivariadas: E) Análisis de componentes principales (ACP) y F) Análisis de Factor discriminante (AFD). Agrupación de los tipos de canto: Canto tipo 1 (círculo verde claro), Canto tipo 2 (círculo azul), Canto tipo 3 (círculo rojo), Canto tipo 4 (círculo naranja) y Canto tipo 5 (círculo verde oscuro). La clasificación de las elipses está soportada por el 100% de confianza para el agrupamiento.

Análisis morfométrico

El análisis de varianza (ANOVA) mostró la existencia de diferencias en los tamaños corporales correspondientes a los cinco grupos identificados en el análisis acústico, con una relación de tamaño conservada para la mayoría de las 18 estructuras medidas (Tabla 4, Fig. 5A–D). De los cinco grupos identificados, los individuos con canto de tipo 1 presentaron una mayor longitud rostro-cloaca (LRC), mientras que los individuos con canto tipo 3 fueron los más pequeños en su LRC (Fig. 5A). Esta misma relación fue conservada para las demás variables, como se puede observar en las longitudes de la mano (LM) y de la pata (LP) (Fig. 5C–D), pero en cuanto al diámetro del ojo (DO), fueron los individuos con canto de tipo 5 los que presentaron un mayor tamaño para esta estructura (Tabla 4. Fig. 5B).

La prueba post hoc de Tuckey HSD permitió identificar que estas diferencias se daban principalmente entre los individuos que presentan cantos de tipo 1 y tipo 5, con los individuos de canto tipo 2, tipo 3 y tipo 4 (Tabla S3). Sin embargo, el ACP reveló una notable superposición entre todos los grupos (Fig. 5E), exceptuando los individuos que presentan canto tipo 4, que difieren de los individuos con canto tipo 1 y tipo 5, siendo el único caso en que uno de los grupos no está superpuesto. Este análisis es explicado por un 79,4% de variación, donde el CP1 explicó el 72,4% de proporción de variación y mostró una alta correlación entre todas las variables (Tabla 5), mientras que el CP 2 explicó solo el 6,8% de la variación. Esta clasificación fue respaldada por el análisis de factor discriminante (AFD) basado en los puntajes del ACP, con una confiabilidad del 100% (Fig. 5F). El resumen de las medidas morfométricas de los 50 individuos machos medidos se muestra en la Tabla 4.

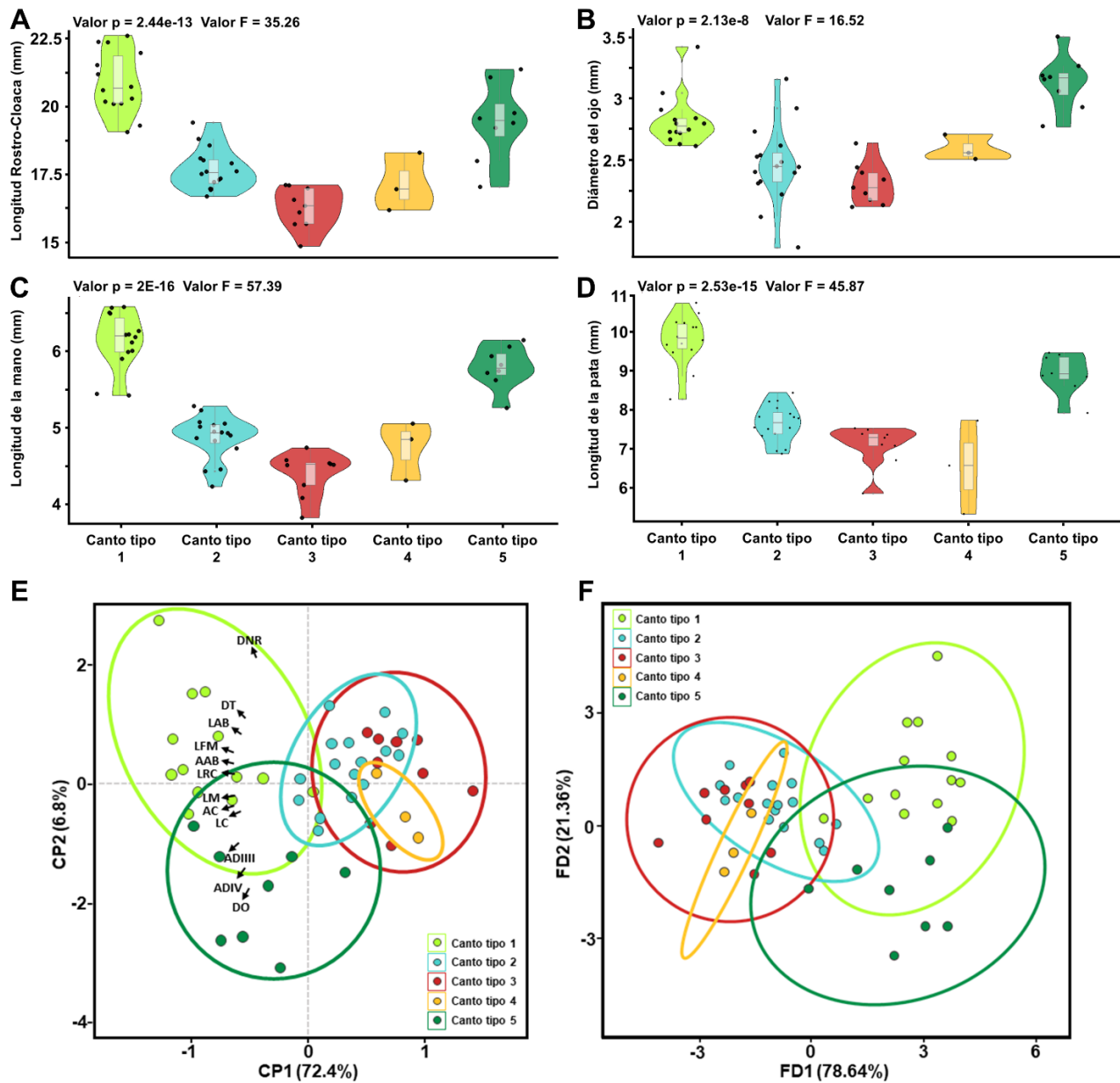


Figura 5. A–D) Diferencias morfométricas de los individuos de *Pristimantis paisa* de las diferentes poblaciones: A) Longitud Rostro-Cloaca (LRC), B) Diámetro del ojo (DO), C) Longitud de la mano (LM) y D) Longitud de la pata (LP). E–F) Pruebas multivariadas de las variables morfométricas: E) Análisis de componentes principales (ACP) y F) Análisis de Factor Discriminante (AFD). Agrupación de los individuos de acuerdo con los cinco grupos obtenidos en el análisis acústico: Canto tipo 1 (círculo verde claro), Canto tipo 2 (círculo azul), Canto tipo 3 (círculo rojo), Canto tipo 4 (círculo naranja) y Canto tipo 5 (círculo verde oscuro). La clasificación de las elipses está soportada por el 100% de confianza para el agrupamiento.

Análisis morfológico

En términos generales, los individuos presentan un tamaño pequeño y dimorfismo sexual marcado en su longitud rostro-cloaca (LRC), siendo las hembras más grandes que los machos en todos los casos (Fig. 6A–E), la diferencia de tamaño entre machos y hembras fue mayor para los individuos con canto tipo 3 y tipo 4 (Fig. 6C–D) y las hembras de las poblaciones con canto tipo 1 y tipo 5 fueron las que presentaron un mayor tamaño (Fig. 6A y E). La cabeza es más ancha que larga e igual de ancha que el cuerpo en los machos (Fig. 7A, B y D–L), mientras que en las hembras es ligeramente más estrecha que el cuerpo (Fig. 7C). El rostro es subacuminado en vista dorsal (Fig. 7A–L), con presencia de barras labiales que se extienden desde el labio superior hasta la región inferior del ojo. Los ojos son de color dorado, más oscuro en algunos individuos con canto tipo 4, y con una franja gruesa de color cobrizo rodeando la pupila, que es horizontal. Todos los machos presentan almohadilla nupcial blanca en el pulgar. La coloración del dorso es variada, con tonos que van del café claro y beige, al café rojizo y café oscuro.

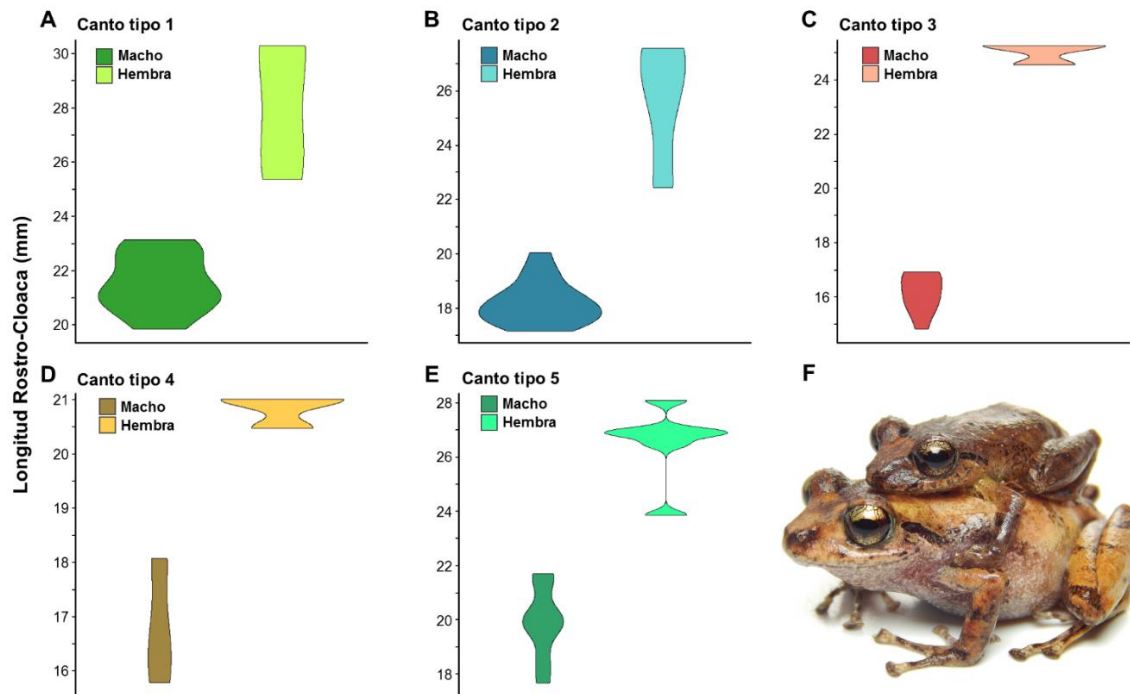


Figura 6. Dimorfismo sexual de las diferentes poblaciones acústicas. A–E) Clasificación de acuerdo a los tipos de canto de los individuos. F) Amplexus de *Pristimantis "paisa"* canto tipo 5 (MRC1954, LRC 19,53 mm ♂ y MRC1955, LRC 26,96 mm ♀).

Hay una gran diversidad en los patrones de coloración dorsal, pudiendo encontrarse: (1) patrones en forma de “W” dirigidos hacia el rostro (Fig. 7A, B, C, E, I y K), (2) franjas dispuestas longitudinalmente desde el rostro hasta la cloaca (Fig. 7D, F y H), (3) dorso uniforme con costados más claros (Fig. 7G y J) o (4) dorso completamente uniforme (Fig. 7L). Algunos individuos pueden presentar una línea longitudinal blanca desde la punta del rostro hasta la cloaca (Fig. 7D y L). De todos los patrones dorsales encontrados, el patrón con forma de “W” es el único que se comparte para todos los grupos y es el único exhibido por *P. paisa* a lo largo de las localidades en las que se encontró. El patrón de líneas longitudinales fue el segundo más compartido entre los grupos, exhibido por algunos individuos con canto de tipo 2, tipo 3 y tipo 4. Por su parte, los individuos con canto de tipo 5 fueron los únicos a los que se pudo asignar un carácter morfológico discreto, ya que presentan ojos más grandes en comparación a los individuos con canto tipo 1, tipo 2, tipo 3 y tipo 4, con un DO 23% por encima del promedio (Tabla 4, Fig. 7J–L).

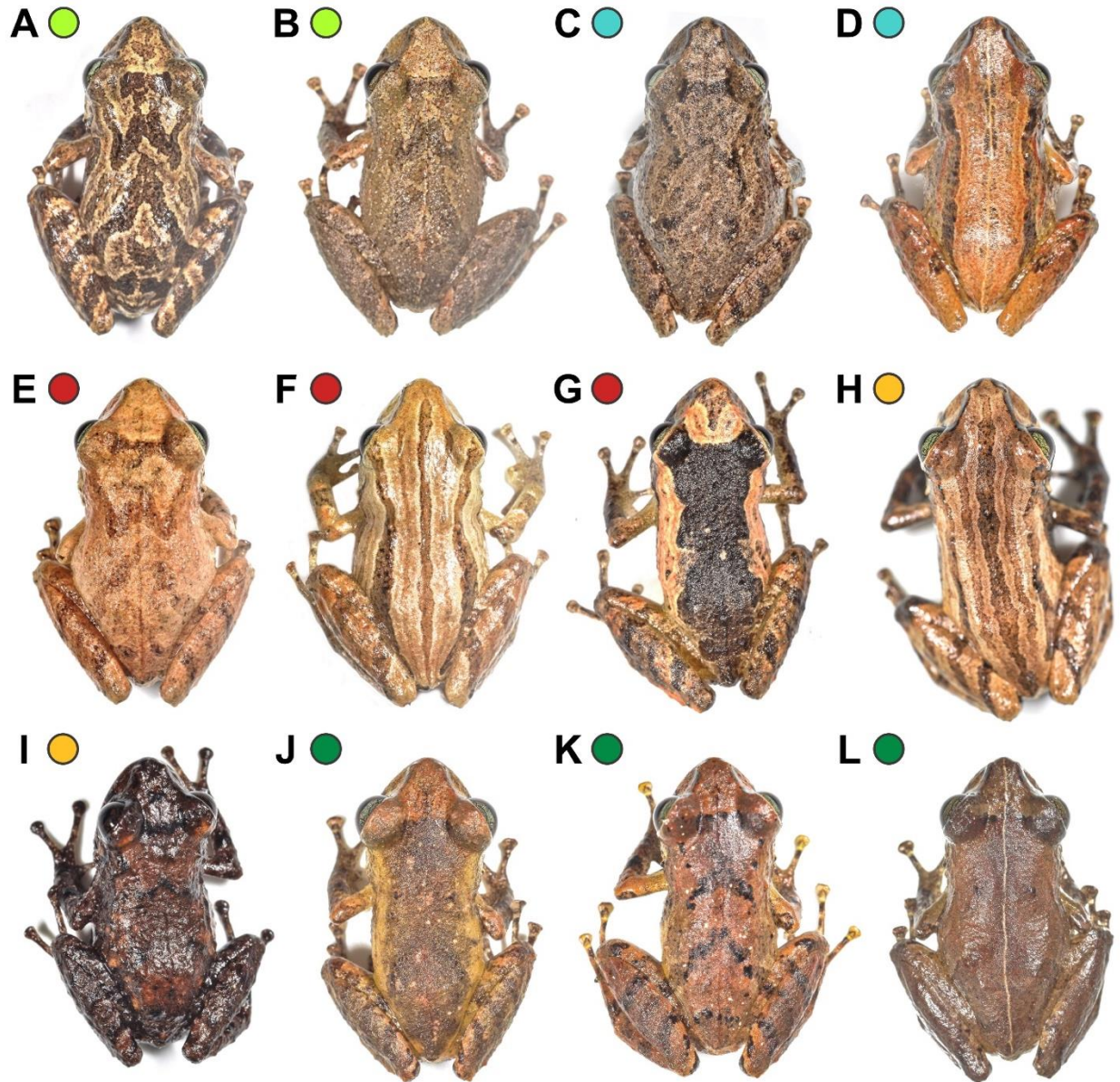


Figura 7. Variación de los patrones de coloración dorsal de individuos de *Pristimantis paisa* de las diferentes localidades evaluadas. A) MRC1779, LRC 20,08 mm ♂, La Unión; B) MRC1833, LRC 20,06 mm ♂, Medellín (Localidad tipo); C) MRC1549, LRC 26,46 mm ♀, El Carmen de Viboral; D) MRC1551, LRC 17,57 mm ♂, El Carmen de Viboral; E) MRC1778, LRC 17,05 mm ♂, La Unión; F) MRC1785, LRC 14,79 mm ♂, La Unión; G) MRC1240, LRC 16,28 mm ♂, Santa Rosa de Osos; H) MRC1941, LRC 16,13 mm ♂, Valdivia; I) MRC 1937, LRC 16,91 mm ♂, Valdivia; J) MRC1940, LRC 19,73 mm ♂, Valdivia; K) MRC1946, LRC 17,95 mm ♂, L) MRC1950, LRC 16,99 mm ♂. El código de color refiere al tipo de canto que presenta cada individuo: Color verde claro (canto tipo 1). Color azul (canto tipo 2), color rojo (canto tipo 3), color naranja (canto tipo 4) y color verde oscuro (canto tipo 5).

Análisis filogenético

El análisis incorporó 770 caracteres moleculares invariantes (= 56,2% de todos los sitios) y 611 posiciones informativas (= 44,7% de todos los sitios). El árbol de máxima verosimilitud (-lnL = -16533,67, AICc = 33593,3) recuperó un alto soporte en la mayoría de las ramas (Fig. 8A). La topología inferida más óptima recuperó a *Pristimantis paisa* [sensu lato] polifilético formando al menos cuatro clados congruentes con los tipos de canto (la población asignada al canto tipo 4 no fue incluida en el análisis filogenético por carecer de secuencias moleculares a la fecha). Los resultados recuperaron solo dos clados estrechamente relacionados entre sí con máximo soporte. El clado asignado a *P. paisa* [sensu stricto] (canto tipo 1) se recuperó relacionado a un clado conformado por *P. juanchoi*, *P. palmeri*, *P. paisa* (canto tipo 5) y *P. cf. helvolus*. Mientras que *P. paisa* (canto tipo 2) y *P. paisa* (canto tipo 3) fueron recuperadas como clados hermanos de un clado conformado por *P. zophus*, *P. tochus* y *P. aff. zophus*.

Las distancias genéticas no corregidas para el marcador COI en *Pristimantis paisa* fueron relativamente altas (Tabla S4). Entre los clados recuperados, las distancias más bajas se evidenciaron entre *P. paisa* con cantos tipo 2 y canto tipo 3, con rangos entre 8,9 y 10,2%, por el contrario, las diversidades genéticas más altas fueron entre *P. paisa* canto tipo 1 y canto tipo 5 con distancias entre 17,2 y 17,7% (Fig. 8B, Tabla S4). Mientras que al interior de *P. paisa* [sensu stricto] (canto tipo 1) el rango de distancia fue de 0,0 y 0,7% (16 individuos), para el clado con canto tipo 2 el rango fue de 0,0 y 1,5% (11 individuos), para el clado con canto tipo 3 las distancias tuvieron un rango entre 0,0 y 0,6% (8 individuos), y finalmente para el clado con canto tipo 5 los haplotipos no mostraron diferencias entre los individuos analizados (3 individuos).

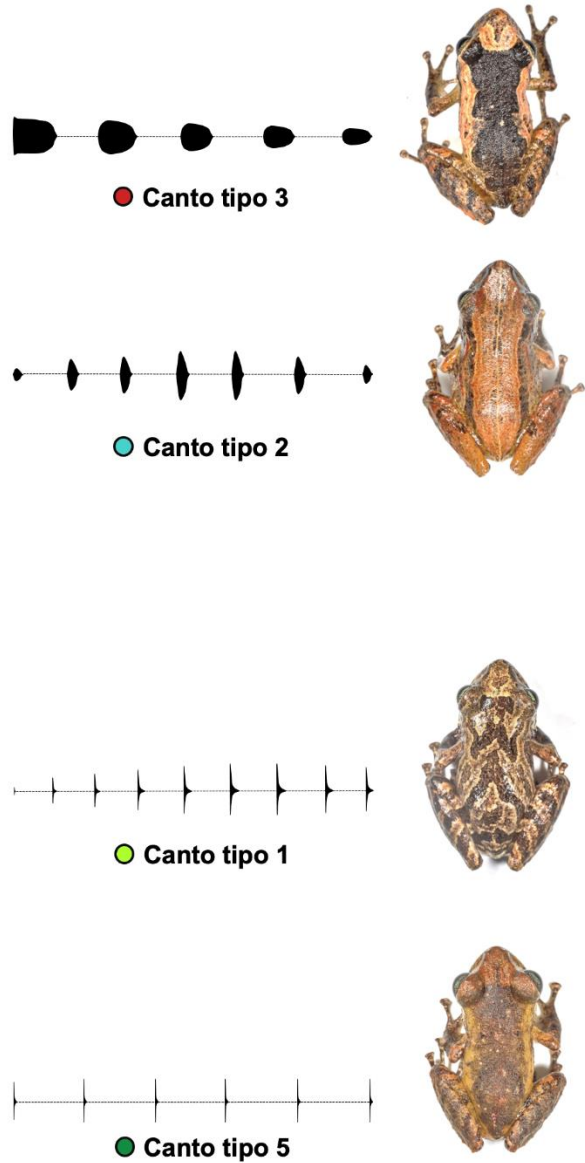
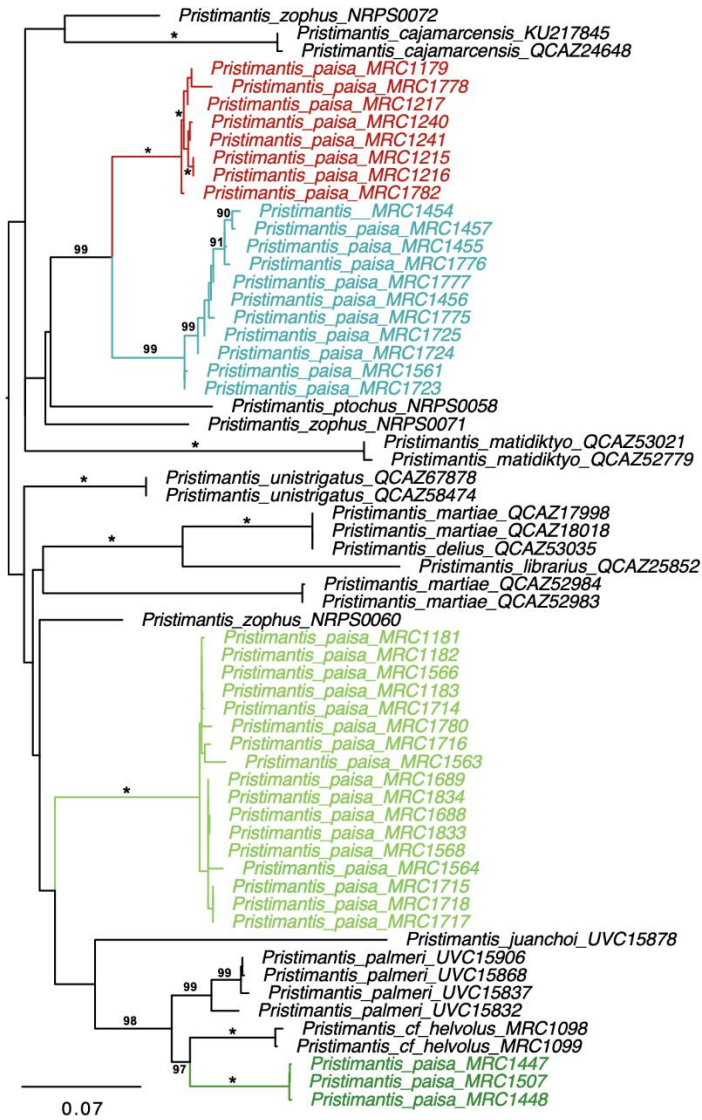
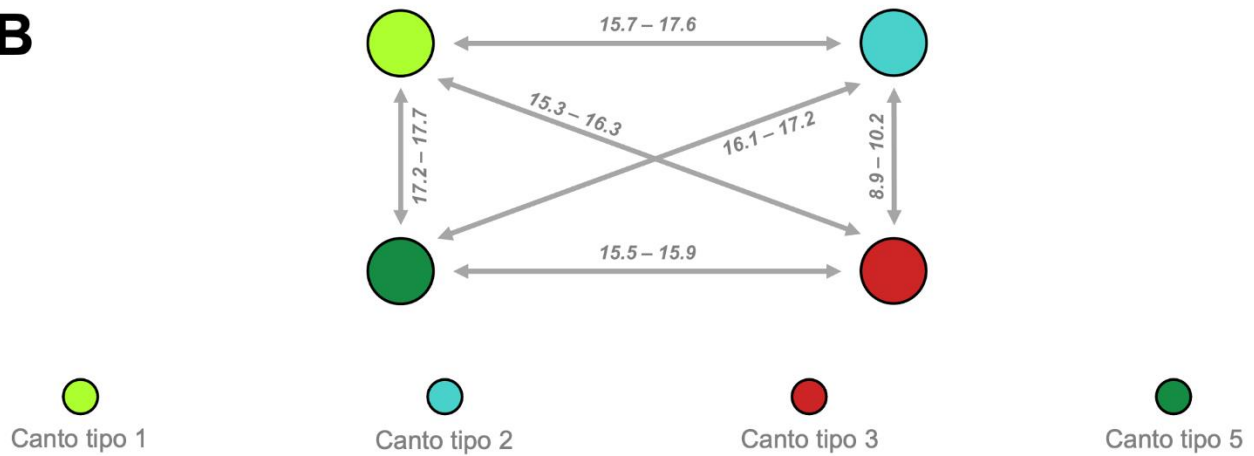
A**B**

Figura 8. A) Árbol de máxima verosimilitud ($-\ln L = -16533,67$) que representa las relaciones evolutivas dentro de *Pristimantis* inferidas de un análisis utilizando 1476 sitios, cuatro regiones genómicas y 132 terminales. El árbol completo se muestra en el apéndice 1. B) Distancias genéticas no corregidas entre las cuatro entidades de *Pristimantis paisa* incluidas en el análisis filogenético. La distancia genética está dada en porcentaje y basada en 630 sitios alineados de COI. El código de color refiere al tipo de canto que presenta cada individuo. Los soportes de las ramas se muestran a partir de valores superiores a 90% y los asteriscos representan valores de soporte del 100%.

DISCUSIÓN

El género *Pristimantis*, con frecuencia, exhibe altos niveles de diversidad críptica (Elmer y Cannatella, 2008; Padial y De la Riva, 2009; Hutter y Guayasamín, 2015; Ortega-Andrade *et al.* 2015; Páez y Ron, 2019; Trevisan *et al.* 2020) lo que probablemente ha llevado a una notable subestimación de la riqueza de especies. Tradicionalmente los trabajos taxonómicos sobre el límite de especies suelen estar basados en diferencias fenotípicas discretas, es decir atributos diagnósticos usualmente no superpuestos entre individuos. Sin embargo, por las dificultades de encontrar empíricamente uno o más caracteres diagnósticos, se ha naturalizado usar al menos 14 estados de carácter como conjunto de información diagnóstica; esto ha sido casi una tradición desde la propuesta formal por Lynch y Duellman (1997). La fuente de evidencia predominante en ese conjunto de diagnosis para desarrollo de estos trabajos taxonómicos ha sido la morfología (ver Lynch y Duellman, 1980; Lynch, 1986; Lynch y Duellman, 1997, Chaparro *et al.* 2012; Ortega-Andrade y Valencia, 2012; Brito y Almendáriz, 2018), como es el caso de las especies incluidas en el complejo *Pristimantis taeniatus* agrupación a la que pertenece *P. paisa*, nuestra especie modelo de estudio (ver Lynch y Ardila-Robayo, 1999).

No obstante, recientemente se ha empleado con mayor frecuencia las vocalizaciones en la delimitación y descripción de especies en el género *Pristimantis* (Arteaga *et al.* 2013; Padial *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2017; Ospina-Sarria y Angarita-Sierra, 2020; Rivera-Correa y Daza, 2020). Los cantos de anuncio constituyen una importante herramienta para inferir barreras reproductivas precigóticas (Vences y Wake, 2007) lo que los constituye, a su vez, en un buen indicador para la identificación entre especies

(Padial *et al.* 2008; Padial y De La Riva 2009) y para la detección de diferencias entre ellas. *Pristimantis* es el género con mayor diversidad de anuros de Colombia, 230 de las 850 especies pertenecen a éste (Acosta-Galvis, 2021), sin embargo, es uno de los más desconocidos en términos de su canto de anuncio, a solo 17 especies se les ha descrito formalmente la vocalización en el país, (Rivera-Correa *et al.* en prensa). En ese sentido, a la fecha se desconocía el canto de anuncio de *Pristimantis paisa* y si esta vocalización pudiese presentar variaciones en orden de ser cuantificadas, por lo tanto, nuestros resultados revelan una diversidad acústica más sorprendente de lo previamente sospechado.

La variación en el canto de anuncio a nivel intraespecífico se ha documentado en algunas especies del género, principalmente en atributos estructurales como el número de notas por canto (Batallas y Brito, 2016; Hutter *et al.* 2015; Ríos-Soto y Ospina-L, 2018), lo cual puede interpretarse como una respuesta competitiva de los machos a otros individuos conespecíficos en defensa del territorio o para aumentar las posibilidades de atraer hembras (ver Wells, 2007). En nuestro caso, la variación en el número de notas registrado para cada tipo de canto fue muy similar entre ellos (Tabla S2. Fig. 4D). Sin embargo, la variación encontrada en las diferentes poblaciones analizadas de *P. paisa* no se limita únicamente a atributos estructurales. El análisis de componentes principales indicó que dentro de las variables que más aportan a la variación están la duración del canto y la frecuencia dominante, dos atributos acústicos muy relevantes y ampliamente utilizados en taxonomía de anuros (Köhler *et al.* 2017), siendo la frecuencia dominante, en particular, un factor importante para el reconocimiento y la identificación de especies (Gerhardt, 1991; Gerhardt y Huber, 2002), lo que podría estar sugiriendo procesos de especiación, más que a polimorfismo interpoblacional.

De los cinco tipos de canto encontrados en este estudio, el canto tipo 1 corresponde realmente a *Pristimantis paisa*, ya que es el tipo de canto emitido por los individuos registrados en la localidad tipo de la especie y donde sucesivos muestreos en diferentes épocas del año no revelaron simpatría con otra población acústica. De acuerdo con nuestras comparaciones, este tipo de canto fue el de mayor duración

(Fig. 4A), diferenciándose a las restantes poblaciones acústicas (Tabla S2). La prueba post hoc de Tuckey indicó que ninguno de los tipos de cantos presenta similitudes en la frecuencia dominante, exceptuando los cantos tipo 2 y tipo 5, quienes no mostraron diferencias significativas para esta variable (Tabla S2, Fig. 4B). Dado que las diferencias entre poblaciones y/o especies en caracteres como la frecuencia dominante pueden ser más relevantes que las diferencias en caracteres temporales (Castellano & Giacoma, 1998; Köhler *et al.* 2017), la frecuencia dominante, en este caso, estaría proporcionando una fuerte evidencia de divergencia entre las poblaciones de la especie, sugiriendo la existencia de entidades evolutivas diferentes, al menos desde la perspectiva acústica, resultados opuestos a los datos preliminares propuestos a nivel morfológico, que sugieren que no existen diferencias marcadas entre las poblaciones de *P. paisa*.

Se observó que ninguno de los tipos de canto presenta un marcado patrón geográfico reflejado en las poblaciones analizadas, ya que se encontraron poblaciones en las que individuos con diferentes tipos de canto estaban presentes (Fig. 2), como es el caso de las Veredas San Fermín (Valdivia), La Madera (El Carmen de Viboral) y La Cabaña (La Unión), donde ocurren por lo menos dos poblaciones acústicas, indicando una distribución simpátrica entre estas entidades. Se ha sugerido que la disimilitud en el canto de poblaciones simpátricas puede indicar diversificación de las unidades taxonómicas (Duellman & Pyles 1983; Bridges & Dorcas 2000; Wells 2007; Toledo *et al.* 2015), lo que podría sugerir, a su vez, que presiones selectivas estén promoviendo la divergencia bioacústica evitando un solapamiento en la emisión de la señal.

Por el contrario, la morfometría fue insuficiente para distinguir entre grupos ya que las distribuciones de las variables analizadas se superponen notablemente, a pesar de que es posible destacar algunas características entre los tamaños corporales de algunos de los grupos. Algunos autores sugieren que la variación en el tamaño corporal puede ser explicada por múltiples factores ambientales asociados a efectos climáticos y geográficos (Angilletta & Dunham, 2003; Ficetola *et al.*, 2010; Valenzuela-

Sánchez *et al.*, 2015). *Pristimantis paisa* (canto tipo 1) y los individuos con canto tipo 5 exhiben tamaños corporales más grandes y similares entre ellos que con cualquiera de los otros tres tipos de canto (Tabla 4, Fig. 5A–D) y a pesar de que en este trabajo no se evaluó la relación entre variables ambientales y corporales, probablemente estas diferencias encontradas no se deban a factores ambientales ya que la distribución altitudinal y latitudinal es muy similar para todas las poblaciones evaluadas, lo cual podría indicar que la disimilitud en el tamaño corporal encontrado en estos grupos pueda deberse a un evento de divergencia producto de la historia evolutiva de las especies. En términos de la morfología externa, no fue posible encontrar un atributo morfológico diagnóstico claramente diferenciable para cada uno de los grupos, pero se observó una amplia variación morfológica intra e interpoblacional, especialmente en la coloración dorsal, como ocurre típicamente en varias especies del género *Pristimantis* (Lynch, 1968; Lynch, 1980; Arteaga *et al.* 2013; Rivera-Prieto *et al.* 2014; Hutter *et al.* 2015). Esta variación suele estar relacionada a factores geográficos en los que destaca la presencia de patrones morfológicos únicos, cuya ocurrencia permite identificar poblaciones específicas de otras poblaciones de la misma especie (Lynch, 1992). Sin embargo, la diversidad de patrones, en nuestro caso, no estaba definida por factores geográficos, encontrando diferentes individuos con un mismo tipo de canto presentes dentro de una misma población que exhibían distintos patrones dorsales (i.e. Fig. 7E–F), por lo que esta variación no fue suficientemente informativa para discriminar entre grupos.

En ese sentido, las diferencias morfométricas entre las poblaciones acústicas no fueron tan decisivas como lo fueron las diferencias bioacústicas. Esto es consistente con otros estudios en anuros con morfología críptica (Padial *et al.* 2008; Angulo *et al.* 2010; Funk *et al.* 2011), que sugieren que los caracteres bioacústicos evolucionan más rápido que la morfología (Funk *et al.* 2011), por estar expuestos a mayores presiones selectivas de carácter sexual. Adicionalmente, se ha sugerido que la falta de diferencias morfológicas entre individuos pertenecientes a especies diferentes, en este caso especies crípticas, podría deberse más a la incapacidad operativa de detectar las diferencias a nivel morfológico y

a la falta de empleo de otro conjunto de datos fenotípicos (Chek *et al.* 2001; Elmer y Cannatella, 2008; Páez y Ron, 2019; Patiño *et al.* En revisión). Además, estas dificultades en la detección de diferencias en la morfología pueden deberse al hecho de que la especiación no siempre va acompañada de cambios morfológicos y a que los cambios en la morfología podrían no estar correlacionados con los límites de las especies o bien, podrían no ser útiles para discriminar entre ellas (Bickford *et al.* 2007; Hutter y Guayasamín, 2015).

Las hipótesis previas de la posición filogenética de *Pristimantis paisa* (ver Pinto *et al.* 2012) fueron propuestas a partir de una errada identificación taxonómica (Restrepo *et al.* 2017), por lo tanto, la inferencia obtenida en este trabajo es la primera hipótesis formalmente presentada para la especie. Dicho esto, las relaciones evolutivas recuperadas para *P. paisa* [sensu lato] revelaron una historia filogenética más compleja de lo inicialmente sugerido. La no monofilia y al menos tres clados recuperados (ya que no pudimos obtener secuencias para la *P. "paisa"* con canto tipo 4), uno de ellos con dos entidades acústicamente divergentes (canto tipo 2 y canto tipo 3) fueron congruentes con la evidencia fenotípica a nivel de las vocalizaciones (Fig. 8A), sugiriendo que la taxonomía de la especie ha estado ampliamente subestimada. *Pristimantis paisa* [sensu stricto] es una especie que a la luz de nuestros resultados está relacionada con *P. juanchoi* y *P. palmeri* dos especies con distribución en el flanco occidental de la Cordillera Occidental y con *P. "paisa"* de canto tipo 5 y *P. cf. helvolus*, que se recuperan como clados hermanos (Tabla S4; Fig. 8A). Mientras que los *P. "paisa"* caracterizados con canto tipo 2 y tipo 3 fueron recuperados como especies hermanas y estrechamente relacionados (Tabla S4; Fig. 8A–B), aunque en una relación aún no definida por la presencia de una politomía, con *P. cajamarcensis* y *P. matidiktyo*, dos especies con distribución en Ecuador y Perú, y con *P. ptochus* y *P. zophus* de la Cordillera Occidental de Colombia. La politomía podría ser consecuencia de ausencia de datos para uno de los marcadores (e.g. COI) en algunas de estas especies, impidiendo establecer con claridad la relación de *P. "paisas"* con cantos tipo 2 y tipo 3.

A pesar de no poder incluir una de las entidades acústicas halladas (i.e. canto tipo 4), los resultados obtenidos en los análisis morfométricos mostraron la existencia de un agrupamiento que relaciona los ejemplares de canto tipo 4 con los ejemplares de canto tipo 2 y tipo 3 (Fig. 5E–F), lo que podría sugerir una posible posición filogenética de los individuos con canto tipo 4 cercana a estos dos grupos. Ante este escenario y sumado al hecho de que las relaciones filogenéticas y la diversidad genética entre las poblaciones del género *Pristimantis* presentes en los Andes colombianos son en gran parte desconocidas para la mayoría de las especies (Rivera-Correa y Daza, 2016; Páez y Ron, 2019; Rivera-Correa y Daza, 2020), se hacen necesarios futuros análisis en los que se incluya el material genético de los individuos con canto tipo 4, para determinar su posición filogenética al interior del género.

Nuestros resultados sugieren que en el género *Pristimantis* aún se esconde una gran cantidad de especies crípticas, por tanto, una diversidad notablemente subestimada. Aquí delimitamos a la especie *Pristimantis paisa* y documentamos la existencia de 4 entidades evolutivas morfológicamente crípticas que han sido tratadas históricamente bajo el mismo nombre y que fueron respaldadas por evidencia genética y acústica como entidades diferentes a *P. paisa*. Adicionalmente, a pesar de que nuestro trabajo no permitió una diagnosis con fuertes diferencias morfológicas, proporcionó material sumamente práctico para el reconocimiento de los diferentes patrones morfológicos que puede presentar la especie y las demás entidades relacionadas (Fig. 7A–L), en contraste a la pobre información de carácter morfológico proporcionada por Lynch y Ardila-Robayo (1999) en la descripción original de la especie (Fig. 1). La escasez de información que se proporcionó en la descripción de *P. paisa* se ha debido, en parte, al limitado material con el que disponían en su momento, sin embargo, este aspecto se ha mejorado con el incremento de expediciones, obtención de datos de historia natural, revisiones de colecciones y análisis moleculares recientes. Este trabajo es una muestra clara de la relevancia de integrar diferentes líneas de evidencia para resolver problemas taxonómicos en linajes crípticos dentro de un grupo de ranas altamente diverso y taxonómicamente complejo y demuestra la necesidad de realizar estudios

exhaustivos de la diversidad críptica en los anfibios andinos, especialmente en las ranas del género *Pristimantis*.

Aunque este trabajo empírico fue diseñado para comprender las relaciones e historia evolutiva de una especie protagonista en los bosques altoandinos de Antioquia, nuestra inferencia filogenética reveló que algunas especies requieren futuros trabajos taxonómicos, en los que se incluya evidencia acústica y morfológica y que pueden conducir a una nueva interpretación y delimitación de otras especies. Por ejemplo, encontramos que algunas especies fueron recuperadas como polifiléticas, siendo el caso de *Pristimantis martiae*, con dos terminales QCAZ17998 y QCAZ 18018 molecularmente idénticas a *P. delius* (QCAZ 53035), estas a su vez estrechamente relacionadas a *P. librarius* (QCAZ 25852). *Pristimantis ockendeni*, con una terminal QCAZ 25766 hermana de un clado que contiene a *P. kichwarum* (QCAZ 25866 y QCAZ 52975) estrechamente relacionada con una terminal de *P. ockendeni* (QCAZ 25428). *Pristimantis platydactylus* mostró gran incertidumbre al recuperarse una terminal AC 7614 como hermana de dos clados a su vez polifiléticos, uno de ellos con dos terminales de *P. platydactylus* (CORBIDI 16769 y MVZ 272359) cercanamente relacionadas con *P. llojsintuta* (MNCN7317, MNCN7314, MNCN4121 y MNCN5990), y el otro clado que contiene una terminal de *P. platydactylus* (MBH5746) como hermana de *P. carvalhoi* (CORBIDI16294 y EB 1413) y *P. imitatrix* (KU 215476). Una terminal AJC 0594 de *Pristimantis pirrensis* se recuperó como hermana de un clado que contiene a *P. pardalis* (KRL 0690 y CH 6284) estrechamente relacionada con una terminal de *P. pirrensis* (AJC 0398). Por último, *Pristimantis zophus*, que presentó tres terminales notablemente distantes dentro de la filogenia, dos de ellas (NRPS 0071 y 0072) recuperadas como polifiléticas en el clado que contiene a los *P. "paisa"* con canto tipo 2 y tipo 3, y la tercera (NRPS 0060) se recuperó como hermana del clado que contiene a *P. paisa* [sensu stricto]. Adicionalmente, la profundidad de las ramas dentro de *Pristimantis taeniatus*, indican distancias genéticas mayores al 7% (Apéndice 1), lo que podría estar sugiriendo la existencia de más de una entidad evolutiva independiente asignada a esta especie, por

lo tanto, poder documentar las vocalizaciones de estas subpoblaciones podría contribuir al entendimiento de sus relaciones filogenéticas, constituyendo un posible caso de diversidad críptica al interior de este linaje.

CONCLUSIONES

El uso de la morfología como única línea de evidencia para descripción y delimitación de las especies es muy limitada. La diversidad oculta bajo el nombre de *Pristimantis paisa* y las relaciones filogenéticas de la especie habían sido subestimadas. La existencia de cinco entidades evolutivas que habían sido tratadas históricamente bajo el nombre de *P. paisa*, que fueron corroboradas gracias a la combinación de evidencia acústica e información genética y filogenética, son una muestra de que a pesar de la inexistencia de diferencias morfológicas claramente distinguibles, el uso de líneas de evidencia independientes constituyen una herramienta útil para probar y respaldar hipótesis de taxones de especies, especialmente para resolver problemas taxonómicos de manera objetiva. Adicionalmente, teniendo en cuenta la relevancia del uso de la herramientas genéticas y acústicas en la delimitación de especies y descubrimiento de linajes crípticos, consideramos a cada una de ellas como hipótesis taxonómicas estables que merecen una futura delimitación y sean consideradas como especies candidatas confirmadas (CCS) para ser descritas.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta que en algunas poblaciones simpátricas fue posible documentar una posible repartición de la actividad acústica (*Pristimantis "paisa"* con canto tipo 1 y tipo 3, La Cabaña) y un uso de hábitat particularmente marcado (*P. "paisa"* con canto tipo 4 y tipo 5, San Fermín), un estudio más detallado sobre estas variables ecológicas en estas especies podría proporcionar información útil para en entendimiento de su historia natural y evolutiva. Finalmente, ya que nuestro muestreo se realizó en diferentes épocas del año, donde las especies fueron abundantes y acústicamente activas, la alta actividad

acústica y abundancia poblacional de cada una de las entidades podría convertirlas en excelentes modelos para investigación acústica en programas de monitoreo y ecoacústica.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al profesor Mauricio Rivera-Correa por todo su apoyo y acompañamiento en el desarrollo de este trabajo y por todas sus valiosas enseñanzas y oportunidades brindadas durante toda mi formación académica. A todos los profesores que hicieron parte de mi paso por la universidad. A mis compañeros del Semillero de Investigación en Biodiversidad de Anfibios (BIO): Hader Correa, Diego Botero, Eliza Patiño, Andrés Castaño, por todo su apoyo, asistencia en campo y acompañamiento en todo mi proceso de aprendizaje. Al MHUA por el acceso a los especímenes. Al personal de la Seccional Oriente de la Universidad de Antioquia, quienes facilitaron el uso del laboratorio. Al Grupo Herpetológico de Antioquia, en especial a Juan Manuel Daza por facilitar la infraestructura del laboratorio molecular a su cargo. A la Universidad de Antioquia, mi Alma Mater, por abrirme las puertas al maravilloso mundo de la Biología. Agradezco infinitamente a mi familia, quienes siempre me apoyaron y estuvieron para mí todos estos años, especialmente a mi madre quien lo dio todo para que pudiera sacar esta carrera adelante y a quien debo todo lo que ahora represento y he logrado. Por último, a mi segunda familia, mis compañeros de carrera, con quienes tuve la oportunidad de crecer y aprender infinidades, y por quienes todos estos años de carrera fueron los mejores años que he vivido. Este estudio contó con el apoyo financiero parcial del Comité de Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia en el marco del proyecto “Código de barras de ADN: Aproximación a la diversidad molecular de anfibios del norte, este y suroeste del departamento de Antioquia” (2017-17209) y una de las becas de la iniciativa Botas al Campo (2018) de la Asociación Colombiana de Herpetología (ACH).

REFERENCIAS

- Acosta, A. R. 2021. Lista de los Anfibios de Colombia: Referencia en línea V.09.2019. Página web accesible en <http://www.batrachia.com>; Batrachia, Villa de Leyva, Boyacá, Colombia.
- AmphibiaWeb. 2021. University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 7 Oct 2020. <https://amphibiaweb.org>
- Angulo, A. and Icochea, J. 2010. Cryptic species complexes, widespread species and conservation: lessons from Amazonian frogs of the *Leptodactylus marmoratus* group (Anura: Leptodactylidae). *Systematics and Biodiversity*, 8(3), 357–370.
- Angilletta, M. J. and Dunham, A. E. 2003. The temperature-size rule in ectotherms: Simple evolutionary explanations may not be general. *The American Naturalist*, 162: 332–342.
- Angulo, A., Cocroft, R. B., Reichle, S. 2003. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Herpetologica* 59: 490–504.
- Arteaga, A., Yáñez-Munoz, M. and Guayasamin, J. M. 2013. A new frog of the *Pristimantis lacrimosus* group (Anura: Craugastoridae) from the montane forests of northwestern Ecuador. Adendum to: “The amphibians and reptiles of Mindo: life in the cloudforest”. *Serie de Publicaciones Científicas, Universidad Tecnológica Indoamérica* 1: 198–210.
- Batallas, D. and Brito, J. 2016. Descripción de las vocalizaciones de *Pristimantis ganonotus* (Anura: Strabomantidae) de Ecuador. *Cuadernos de Herpetología* 30: 31–34.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. and Das, I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology and evolution* 22:148–155.
- Bridges, A. S. and Dorcas, M. E. 2000. Temporal variation in anuran calling behavior: implications for surveys and monitoring programs. *Copeia*, 2: 587–592.
- Bioacoustics Research Program. 2014. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.5) [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven>
- BrITO, J., and Almendáriz, A. 2018. Una especie nueva de rana *Pristimantis* (Amphibia: Strabomantidae) de ojos rojos de la Cordillera de Cónдор, Ecuador. *Cuadernos de Herpetología*, 32: 10.
- Brown, R. M., Siler, C. D., Diesmos, A. C. and Alcala, A. C. 2009. Philippine frogs of the genus *Leptobrachium* (Anura; Megophryidae): Phylogeny-based species delimitation, taxonomic review, and descriptions of three new species. *Herpetological Monographs* 23: 1–44

- Camargo, A., de Sá, R. O. and Heyer, W. R., 2006. Phylogenetic analyses of mtDNA sequences reveal three cryptic lineages in the widespread neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Anura: Leptodactylidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 87:325–341.
- Castellano, S. and Giacoma, C. 1998. Stabilizing and directional female choice for male calls in the European green toad. *Animal Behaviour*, 56: 275–287.
- Chaparro, J.C., Motta, A.P., Gutiérrez, R.C. and Padial, J.M. 2012. A new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from Andean cloud forests of northern Peru. *Zootaxa*, 3192: 39–48.
- Chek, A. A., Lougheed, S. C., Bogart, J. P. and Boag, P. T. 2001. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 370–85.
- Crawford, A. J. and Smith, E. N. 2005. Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 536–555.
- Crawford, A. J., Ryan, M. J. and Jaramillo, C. A. 2010. A new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from the Pacific coast of the Darien Province, Panama, with a molecular analysis of its phylogenetic position. *Herpetologica*, 66: 192–206.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal*, 85: 407–415.
- De Oliveira, E. A., Rodrigues, L. R., Kaefer, I. L., Pinto, K. C. and Hernández-Ruz, E. J. 2017. A new species of *Pristimantis* from eastern Brazilian Amazonia (Anura, Craugastoridae). *ZooKeys*, 687: 101–129.
- Duellman, W. E. and Pyles, R. 1983. Acoustic resource partitioning in anuran communities. *Copeia*, 1983: 639–649.
- Elmer, K. and Cannatella, D. 2008. Three new species of leaf-litter frogs from the upper Amazon forests: cryptic diversity within *Pristimantis* “*ockendeni*” (Anura: Strabomantidae) in Ecuador. *Zootaxa*, 1784: 11–38.
- Elmer, K. R., Dávila, J. A. and Lougheed, S. C. 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf-litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 247.
- Ficetola, G. F., Scali S., Denoël, M., Montinaro, G., Vukov, T. D., Zuffi, M. A. L., and Padoa-Schioppa, E. 2010. Ecogeographical variation of body size in the newt *Triturus carnifex*: comparing the hypotheses using an information-theoretic approach. *Global Ecology and Biogeography*, 19: 485–95.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. and Gemmell, N. J. 2007. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *PLoS ONE* 2: e1109.
- Fouquet A., Martinez Q., Zeidler L., Courtois E. A., Gaucher P., Blanc M., Dias Lima J., Marques Souza S., Rodrigues M. and Kok P. J. R. 2016. Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. *Zootaxa* 4084: 79–104.
- Frost, D. R. 2021. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 6 (DATE OF ACCESS). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Funk, W. C., Caminer, M. and Ron, S. R. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* Published online before print November 30, 2011.
- Gambale, P. G., Signorelli, L. and Bastos, R. P. 2014. Individual variation in the advertisement calls of a Neotropical treefrog (*Scinax constrictus*). *Amphibia-Reptilia*, 35: 271–281.
- García, J. C., Crawford, A. J., Mendoza, Á. M., Ospina, O., Cardenas, H. and Castro, F. 2012. Comparative phylogeography of direct-developing frogs (Anura: Craugastoridae: *Pristimantis*) in the southern Andes of Colombia. *PLoS One* 7: e46077.
- Gerhardt, H. C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42: 615–635.
- Gerhardt HC and Huber F. 2002. *Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions*. Chicago: University of Chicago Press.
- Gergus, E. W. A., Reeder, T. W. and Sullivan, B. K. 2004. Geographic variation in *Hyla wrightorum*: advertisement calls, allozymes, mtDNA, and morphology. *Copeia* 2004: 758–769.
- Glaw, F., Köhler, J., De la Riva, I., Vieites, D. R. and Vences, M. 2010. Integrative taxonomy of Malagasy treefrogs: combination of molecular genetics, bioacoustics and morphology *Boophis*. *Zootaxa* 82: 1–82.
- Hedges, S. B., Duellman, W. E., and Heinicke, M. P., 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*. 2008: 1–182.

- Hepp, F. and Pombal J. P. Jr. 2019. Review of bioacoustical traits in the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae: *Leiuperinae*). *Zootaxa*, 4766 (4): 599–600.
- Heyer, R. W., García-López, J. M. and Cardoso, A. J. 1996. Advertisement call variation in the *Leptodactylus mystaceus* species complex (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new sibling species. *Amphibia-Reptilia* 1996: 7–31.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. and Vinh, L. S. 2018. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 518–522.
- Hutter, C. R. and Guayasamin J. M. 2015. Cryptic diversity concealed in the Andean cloud forests: two new species of rainfrogs (*Pristimantis*) uncovered by molecular and bioacoustic data, *Neotropical Biodiversity*, 1:1, 36–59.
- Hutter, C. R., Liu, V., Kell, T., Lyons, J. A. and Guayasamin, J. M. 2015. The natural history, distribution, and conservation of lonely rainfrogs, *Pristimantis eremitus*. *Herpetologica* 72: 13–22.
- Jiménez de la Espada, M. (1870) Fauna neotropicalis especie quaedam nondum cognitae. *Jornal de Ciências, Matemáticas, Physicas e Naturaes Lisboa*, 3: 57–65.
- Katoh, S. and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772–780.
- Katz, A. D., Giordano, R., and Soto-Adames. F. N. 2015. Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American *Entomobrya* (Collembola: Entomobryidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., and Jermin, L. S. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14 (6): 587–589.
- Köhler, J. 2000. New species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from cloud forest of Bolivia. *Copeia* 2000: 516–520.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P. J. R., Toledo, L. F. and Emmrich, M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251: 1–124.
- Lynch, J. D. 1968. Two new frogs of the genus *Eleutherodactylus* from eastern Ecuador (Amphibia: Leptodactylidae). *J. Herpetol.* 2: 129–135.
- Lynch, J. D. 1980. Systematic status and distribution of some poorly known frogs of the genus *Eleutherodactylus* from the Chocoan lowlands of South America. *Herpetologica* 36: 175–189.

- Lynch, J. D. 1986. New species of *Eleutherodactylus* of Colombia (Amphibia: Leptodactylidae) II: Four species from the cloud forests of the western cordilleras. *Caldasia*, 15 (71-75): 629–647.
- Lynch, J. D. 1992. Distribution and variation in a Colombia frog, *Eleutherodactylus erythropleura* (Amphibia: Leptodactylidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. Amsterdam 27: 211–226.
- Lynch, J. D. and Ardila-Robayo, M. C. 1999. The *Eleutherodactylus* of the *taeniatus* complex in western Colombia: taxonomy and distribution. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23: 615–624.
- Lynch, J. D. and Duellman, W. E. 1980. The *Eleutherodactylus* of the Amazonian slopes of the Ecuadorian Andes (Anura: Leptodactylidae). *Miscellaneous Publication, Museum of Natural History, University of Kansas* 69: 1–86.
- Lynch, J. and Duellman, W. E. 1997. Frogs of genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in Western Ecuador: Systematic, ecology and biogeography. *Special Publication N° 23*. The University of Kansas Museum of Natural History, Lawrence - Kansas.
- Lyra, M. L., Haddad, C. F. B. and Azeredo-Espin, A. M. L. 2017. Meeting the challenge of DNA barcoding amphibians from Neotropics: Polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources* 17: 966–980.
- Navarro-Salcedo, P., Muñoz-Acevedo, S. y Bernal-Bautista, M. H. 2019. *Pristimantis permixtus* (Lynch, Ruíz-Carranza y Ardila-Robayo, 1994). *Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia* 5 (1): 40–46.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. and Minh, B. Q. (2015): IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 268–274.
- Ortega-Andrade, H. M., Rojas-Soto, O. R., Valencia, J. H., Espinosa de los Monteros, A., Morrone, J. J., Ron, S. R. and Cannatella, D. C. 2015. Insights from Integrative Systematics Reveal Cryptic Diversity in *Pristimantis* Frogs (Anura: Craugastoridae) from the Upper Amazon Basin. *PLoS ONE* 10(11): e0143392.
- Ortega-Andrade, H. M. and Valencia, J. H. 2012. A New Species of the *Pristimantis frater* Group (Anura, Strabomantidae) from the Eastern Evergreen Lowland Forests of Ecuador. *Herpetologica* 68 (2): 244–255.
- Ospina-Sarria, J. J. and Angarita-Sierra, T. 2020. A new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from the eastern slope of the Cordillera Oriental, Arauca, Colombia. *Herpetologica*, 76 (1): 83–92.
- Padial, J. M. and De la Riva, I. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnaean Society* 155: 97–122.

- Padial, J. M., Gagliardi-Urrutia, L. A. G., Chaparro, J. C. and Gutiérrez, R. C. 2016. A new species of the *Pristimantis conspicillatus* group from the Peruvian Amazon (Anura: Craugastoridae). *Annals of the Carnegie Museum*, Pittsburgh 83: 207–218.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I. and Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7: 1–14.
- Padial, J. M., Köhler, J., Muñoz, A. and De La Riva, I. 2008. Assessing the taxonomic status of tropical frogs through bioacoustics: Geographical variation in the advertisement calls in the *Eleutherodactylus discoidalis* species group (Anura). *Zoological Journal of the Linnean Society* 152: 353–365.
- Padial, J. M., Grant, T. and Frost, D. R. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825: 1–132.
- Páez, N. B. and Ron, S. R. 2019. Systematics of Huicundomantis, a new subgenus of *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) with extraordinary cryptic diversity and eleven new species. *ZooKeys* 868: 1–112.
- Palacio Baena, J. A., Muñoz Escobar, E. M., Gallo Delgado, S. M. and Rivera-Correa, M. 2006. *Anfibios y Reptiles del Valle de Aburrá*. Medellín, Colombia: Editorial Zuluaga Ltda.
- Peloso P. L. V., De Oliveira R. M., Sturaro M. J., Rodrigues M. T., Lima-Filho G. R., Bitar Y. O. C., Wheeler W. C. and Aleixo A. 2018. Phylogeny of map tree frogs, *Boana semilineata* species group, with a new Amazonian species (Anura: Hylidae). *South American Journal of Herpetology* 13: 150–169.
- Pinto-Sánchez, N. R., Ibáñez, R., Madriñán, S., Sanjur, O. I., Bermingham, E. and Crawford, A. J. 2012. The Great American Biotic Interchange in frogs: Multiple and early colonization of Central America by the South American genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 954–972.
- Reichle, S., Lötters, S. and De la Riva, I. 2001. A new species of the *discoidalis* group of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) from inner-Andean dry valleys of Bolivia. *Journal of Herpetology* 35: 21–26.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>
- Restrepo, A., Velasco, J., and Daza, J. 2017. Extinction risk or lack of sampling in a threatened species: Genetic structure and environmental suitability of the neotropical frog *Pristimantis penelopus* (Anura: Craugastoridae). *Papeís Avulsos De Zoologia* 57: 1–15.
- Ríos-Soto, J. and Ospina L, A. M. 2018. The advertisement call of *Pristimantis boulengeri* (Lynch, 1981) from a population in the Central Andes of Colombia. *Herpetology Notes* (11): 719–723.

- Rivera-Correa, M. and Daza, J.M. 2016. Molecular phylogenetics of the *Pristimantis lacrimosus* species group (Anura: Craugastoridae) with the description of a new species from Colombia. *Acta Herpetológica* 11: 31–45.
- Rivera-Correa, M. and Daza, J. M. 2020. Out of the blue: A new rain frog species of the genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from the northern Cordillera Central in Colombia. *Zootaxa* 4838 (1): 083–101.
- Rivera-Correa, M., Jiménez, C. and Daza, J.M. 2017. Phylogenetic analysis of the Neotropical *Pristimantis leptolophus* species group (Anura: Craugastoridae): molecular approach and description of a new polymorphic species. *Zootaxa* 4242: 313–343.
- Rivera-Prieto, D. A., Rivera-Correa, M. and Daza, J. M. 2014. A new colorful species of *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from the eastern flank of the Cordillera Central in Colombia. *Zootaxa*, 3900(2): 223–242.
- Ron, S. R., Duellman, W. E., Caminer, M. A. and Pazmiño, D. 2018. Advertisement calls and DNA sequences reveal a new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) on the Pacific lowlands of Ecuador. *PLoS ONE* 13: e0203169.
- Santos, J. C., Coloma, L. A. and 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.
- Simões, P. I., Lima, A. P., Magnusson, W. E., Hödl, W. and 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
- Sueur, J., Aubin T., Simonis, C., Lellouch, L., Brown, E. C., Depraetere, M., Desjonqueres, C., Fabianek, F., Gasc, A., Kasten, E., LaZerte, S., Lees, J., Marchal, J., Mikulec, A., Pavoine, S., Pinaud, D. and Stotz, A. 2019. Package ‘seewave’ Version 2.1.4. <https://cran.r-project.org/web/packages/seewave/seewave.pdf> \h
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Molecular Biology of Evolution*. 30: 2725–2729.
- Toledo, L. F., Llusia, D., Vieira, C. A., Corbo, M. and Márquez, R. 2015. Neither convergence nor divergence in the advertisement call of sympatric congeneric Neotropical treefrogs. *Bioacoustics*, 24: 31–47.
- Trevisan, C.C., Batalha-Filho, H., Garda, A.A., Menezes, L., Dias, I. R., Solé, M., Canedo, C., Juncá, F.A. and Napoli, M.F. 2020. Cryptic diversity and ancient diversification in the northern Atlantic Forest *Pristimantis* (Amphibia, Anura, Craugastoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 148:106811.

- Valenzuela-Sánchez, A., Cunningham, A. A. and Soto-Azat, C. 2015. Geographic body size variation in ectotherms: effects of seasonality on an anuran from the southern temperate forest. *Frontiers in Zoology*, 12: 37.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M. and Vieites, D. R. 2005a. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360: 1859–1868.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A. Y., Chiari, Y. and Vieites, D. R. 2005b. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*.
- Vences, M. and Wake, D. 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. In: Heatwole H, ed *Amphibian biology*, Chipping Norton, NSW: Surrey Beatty and Sons, 7: 2613–2671.
- Wells, K. D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago: University of Chicago Press.
- Wycherley, J., Doran, S. and Beebee, T. J. 2002. Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biological Journal of the Linnaean Society* 77: 355–365.

TABLAS

Tabla 1. Localidades de los 89 ejemplares de *Pristimantis paisa* que fueron incluidos en este estudio: 66 ejemplares colectados, 25 de ellos con voucher de audio, y 23 individuos a los que solo se les grabó el canto de anuncio.

N	Municipio	Vereda	Longitud	Latitud	Elevación (m s.n.m.)
19	El Carmen de Viboral	La Madera	-75,328	6,033	2670
1	El Carmen de Viboral	La Chapa	-75,318375	6,03871	2530
4	El Carmen de Viboral	La Rivera	-75,306982	6,091613	2250
2	El Retiro	Don Diego	-75,470083	6,101361	2140
10	La Unión	La Cabana	-75,386	5,939	2345
7	Medellín	La Frisola	-75,673	6,292	2650
4	Rionegro	El Carmín	-75,407755	6,194167	2130
3	Rionegro	Galicia	-75,356635	6,195275	2120
8	Santa Rosa de Osos	Guanacas	-75,359627	6,7004417	2300
4	Sonsón	Roblalito	-75,304	5,696	2450
27	Valdivia	San Fermín	-75,482269	7,094899	1800

Tabla 2, Características de los cinco tipos de cantos de anuncio en las 11 poblaciones evaluadas de *Pristimantis paisa*, obtenidas a partir de 566 cantos (n) provenientes de 48 individuos (N), También se incluyen valores del ANOVA (con $P < 0,05$),

Parámetros acústicos	Tipo de canto					ANOVA	
	Canto tipo 1	Canto tipo 2	Canto tipo 3	Canto tipo 4	Canto tipo 5	Valor F	Valor p
N	16	13	5	12	2		
n	113	164	75	115	99		
Duración del canto (s)	4,039 ± 0,470 (3,504 – 4,982)	0,602 ± 0,269 (0,362 – 1,358)	0,590 ± 0,113 (0,475 – 0,719)	0,558 ± 0,424 (0,206 – 1,727)	0,673 ± 0,328 (0,441 – 0,904)	203,3	2,00E-16
Ancho de banda (kHz)	0,687 ± 0,136 (0,495 – 0,937)	0,383 ± 0,044 (0,266 – 0,452)	0,350 ± 0,010 (0,339 – 0,366)	0,472 ± 0,048 (0,392 – 0,560)	0,689 ± 0,126 (0,600 – 0,778)	27,73	2,66E-11
Frecuencia mínima (kHz)	2,565 ± 0,172 (2,003 – 2,771)	2,122 ± 0,046 (2,038 – 2,217)	2,926 ± 0,118 (2,756 – 3,039)	3,305 ± 0,075 (3,144 – 3,381)	2,101 ± 0,019 (2,088 – 2,114)	411,5	2,00E-16
Frecuencia dominante (kHz)	2,886 ± 0,168 (2,347 – 3,087)	2,360 ± 0,042 (2,279 – 2,412)	3,095 ± 0,104 (2,934 – 3,190)	3,587 ± 0,084 (3,402 – 3,695)	2,399 ± 0,012 (2,391 – 2,407)	414,8	2,00E-16
Frecuencia máxima (kHz)	3,252 ± 0,195 (2,842 – 3,671)	2,505 ± 0,038 (2,430 – 2,555)	3,276 ± 0,119 (3,095 – 3,384)	3,777 ± 0,079 (3,618 – 3,893)	2,790 ± 0,107 (2,714 – 2,865)	205,2	2,00E-16
N notas/canto	8–15	5–23	3–5	2–29	1–11	8,542	3,88E-05
Duración de la nota (s)	0,007 ± 0,001 (0,005 – 0,010)	0,020 ± 0,005 (0,012 – 0,028)	0,068 ± 0,009 (0,060 – 0,081)	0,014 ± 0,002 (0,009 – 0,019)	0,005 ± 0,0001 (0,005 – 0,006)	217	2,00E-16
Duración del intervalo entre notas (s)	0,380 ± 0,073 (0,280 – 0,499)	0,056 ± 0,008 (0,048 – 0,074)	0,080 ± 0,014 (0,072 – 0,104)	0,100 ± 0,013 (0,081 – 0,119)	0,206 ± 0,032 (0,183 – 0,229)	135,6	2,00E-16
Frecuencia de la nota (kHz)	2,813 ± 0,178 (2,252 – 3,044)	2,294 ± 0,037 (2,236 – 2,338)	3,091 ± 0,112 (2,921 – 3,193)	3,526 ± 0,073 (3,368 – 3,631)	2,349 ± 0,016 (2,337 – 2,360)	-	-
N armónicos/nota	1–3	0–4	0–4	0–4	0–8	-	-
Frecuencia del primer armónico (kHz)	5,577 ± 0,380 (4,388 – 5,994)	4,596 ± 0,076 (4,459 – 4,699)	6,221 ± 0,259 (5,840 – 6,463)	6,991 ± 0,134 (6,797 – 7,213)	4,421 ± 0,087 (4,359 – 4,482)	-	-
Frecuencia del segundo armónico (kHz)	8,517 ± 0,674 (6,596 – 9,273)	6,880 ± 0,161 (6,634 – 7,200)	9,361 ± 0,367 (8,770 – 9,666)	10,707 ± 0,284 (10,506 – 10,908)	6,786 ± 0,098 (6,717 – 6,855)	-	-
Frecuencia del tercer armónico (kHz)	10,818 ± 1,472 (9,121 – 11,755)	9,272 ± 0,109 (9,182 – 9,393)	12,019 ± 0,465 (11,691 – 12,348)	14,143 ± 0,163 (14,028 – 14,258)	9,087 ± 0,071 (9,037 – 9,137)	-	-

Frecuencia del cuarto armónico (kHz)	14,467 ± 0 (14,467 – 14,467)	11,355 ± 0,284 (11,154 – 11,556)	15,506 ± 0 (15,506 – 15,506)	17,635 ± 0,228 (17,474 – 17,796)	11,510 ± 0,350 (11,263 – 11,757)	-	-
Frecuencia del quinto armónico (kHz)	-	-	-	-	13,980 ± 0 (13,980 – 13,980)	-	-
Frecuencia del sexto armónico (kHz)	-	-	-	-	16,994 ± 0 (16,994 – 16,994)	-	-
Frecuencia del séptimo armónico (kHz)	-	-	-	-	19,444 ± 0 (19,444 – 19,444)	-	-
Frecuencia del octavo armónico (kHz)	-	-	-	-	21,232 ± 0 (21,232 – 21,232)	-	-

Tabla 3, Análisis de Componentes Principales correspondiente a las variables bioacústicas,

Parámetros acústicos	Componentes principales	
	PC1	PC2
DC	* -0,500	0,073
AB	* -0,473	-0,042
Fmin	0,000	* -0,570
FD	-0,055	* -0,569
Fmax	-0,151	* -0,552
Notas,canto	-0,342	0,186
DN	0,367	-0,062
DIN	* -0,499	0,022
Desviación estándar	1,834	1,736
Proporción de variación (%)	0,4203	0,3767
Proporción acumulada (%)	0,4203	0,7971

Tabla 4, Medidas morfométricas de los individuos clasificados en cinco grupos por tipo de canto de *Pristimantis paisa*, obtenidas de 50 individuos (N), provenientes de las 11 poblaciones evaluadas, También se incluyen valores del ANOVA (con $P < 0,05$), MM = Medidas morfométricas,

MM	Tipo de canto					ANOVA	
	Canto tipo 1	Canto tipo 2	Canto tipo 3	Canto tipo 4	Canto tipo 5	Valor F	Valor p
N	15	16	9	3	7		
LRC	20,86 ± 1,15 (19,03 – 22,60)	17,64 ± 0,75 (16,64 – 19,37)	16,21 ± 0,78 (14,79 – 17,06)	17,10 ± 1,07 (16,13 – 18,26)	19,39 ± 1,45 (16,99 – 21,35)	35,26	2,44E-13
AC	7,87 ± 0,37 (7,18 – 8,70)	6,65 ± 0,41 (5,88 – 7,31)	6,30 ± 0,37 (5,40 – 6,66)	6,48 ± 0,24 (6,21 – 6,67)	7,59 ± 0,58 (6,60 – 8,32)	29,01	5,98E-12
LC	7,09 ± 0,36 (6,35 – 7,72)	6,27 ± 0,22 (5,83 – 6,60)	5,82 ± 0,26 (5,41 – 6,18)	5,48 ± 0,54 (4,86 – 5,83)	7,20 ± 0,48 (6,37 – 7,68)	37,25	9,61E-14
DO	2,83 ± 0,20 (2,63 – 3,42)	2,47 ± 0,32 (1,81 – 3,16)	2,32 ± 0,16 (2,14 – 2,65)	2,60 ± 0,11 (2,52 – 2,72)	3,14 ± 0,21 (2,78 – 3,50)	16,52	2,13E-08
DON	2,38 ± 0,15 (2,04 – 2,56)	2,07 ± 0,13 (1,88 – 2,46)	2,09 ± 0,10 (1,94 – 2,28)	1,75 ± 0,40 (1,30 – 2,07)	2,38 ± 0,16 (2,09 – 2,58)	16,58	2,04E-08
DNR	1,37 ± 0,16 (1,15 – 1,69)	1,21 ± 0,11 (1,05 – 1,52)	1,13 ± 0,10 (1,01 – 1,28)	1,13 ± 0,11 (1,03 ± 1,24)	1,18 ± 0,11 (0,98 – 1,33)	6,636	0,000275
DIN	1,93 ± 0,08 (1,83 – 2,07)	1,83 ± 0,18 (1,27 – 2,00)	1,85 ± 0,11 (1,76 – 2,09)	1,76 ± 0,09 (1,68 – 1,86)	1,94 ± 0,13 (1,66 – 2,08)	2,19	0,0853
DIO	4,29 ± 0,27 (3,63 – 4,80)	3,66 ± 0,18 (3,27 – 3,86)	3,65 ± 0,28 (2,96 – 3,83)	3,62 ± 0,08 (3,53 – 3,66)	4,27 ± 0,34 (3,81 – 4,82)	19,5	2,29E-09
DT	1,01 ± 0,11 (0,88 – 1,23)	0,83 ± 0,09 (0,70 – 1,04)	0,73 ± 0,06 (0,63 – 0,82)	0,79 ± 0,08 (0,69 – 0,84)	0,81 ± 0,11 (0,69 – 0,98)	13,61	2,37E-07
LAB	5,26 ± 0,30 (4,43 – 5,57)	4,52 ± 0,21 (4,22 – 4,88)	4,41 ± 0,23 (3,97 – 4,76)	4,36 ± 0,23 (4,14 – 4,59)	4,86 ± 0,27 (4,29 – 5,08)	23,01	2,11E-10
AAB	1,70 ± 0,19 (1,30 – 2,00)	1,28 ± 0,16 (1,04 – 1,60)	1,01 ± 0,09 (0,89 – 1,19)	1,15 ± 0,12 (1,00 – 1,23)	1,48 ± 0,13 (1,34 – 1,71)	31,34	1,72E-12

LM	6,14 ± 0,37 (5,42 – 6,59)	4,86 ± 0,29 (4,22 – 5,28)	4,39 ± 0,29 (3,81 – 4,73)	4,73 ± 0,39 (4,30 – 5,05)	5,79 ± 0,28 (5,26 – 6,15)	57,39	2,00E-16
LFM	11,21 ± 0,64 (9,61 – 12,08)	9,08 ± 0,45 (8,18 – 9,76)	8,60 ± 0,48 (7,62 – 9,24)	8,14 ± 0,31 (7,92 – 8,50)	9,95 ± 0,41 (9,23 – 10,51)	55,26	2,00E-16
LT	11,38 ± 0,46 (10,63 – 12,25)	9,38 ± 0,40 (8,60 – 10,08)	8,92 ± 0,40 (8,01 – 9,25)	8,58 ± 0,29 (8,27 – 8,86)	10,19 ± 0,59 (9,47 – 11,35)	60,51	2,00E-16
LTA	6,76 ± 0,28 (6,04 – 7,05)	5,90 ± 0,24 (5,44 – 6,42)	5,52 ± 0,61 (4,05 – 5,95)	5,17 ± 0,07 (5,09 – 5,22)	6,00 ± 0,45 (5,44 – 6,66)	21,76	4,80E-10
LP	9,77 ± 0,63 (828 – 10,70)	7,67 ± 0,47 (6,91 – 8,45)	7,12 ± 0,51 (5,91 – 7,55)	6,59 ± 1,17 (5,40 – 7,75)	8,93 ± 0,50 (7,94 – 9,45)	45,87	2,53E-15
ADIII	1,14 ± 0,12 (0,88 – 1,38)	0,82 ± 0,11 (0,49 – 0,99)	0,71 ± 0,13 (0,52 – 0,98)	0,87 ± 0,08 (0,78 – 0,94)	1,14 ± 0,10 (0,98 – 1,33)	29,98	3,53E-12
ADIV	1,10 ± 0,16 (0,84 – 1,43)	0,89 ± 0,12 (0,56 – 1,05)	0,70 ± 0,12 (0,56 – 0,95)	0,82 ± 0,20 (0,63 – 1,02)	1,20 ± 0,07 (1,09 – 1,29)	21,36	6,25E-10

Tabla 5, Análisis de Componentes Principales correspondiente a las variables morfométricas,

Parámetros acústicos	Componentes principales	
	PC1	PC2
LRC	* -0,263	0,040
AC	* -0,264	-0,099
LC	-0,252	-0,126
DO	-0,200	* -0,460
DON	-0,204	-0,201
DNR	-0,169	* -0,532
DIN	-0,124	0,080
DIO	-0,252	-0,100
DT	-0,215	0,290
LAB	-0,256	0,137
AAB	-0,253	0,089
LM	* -0,266	-0,057
LFM	-0,260	0,142
LT	-0,262	0,161
LTA	-0,233	0,223
LPA	* -0,264	0,047
ADIII	-0,239	-0,267
ADIV	-0,210	-0,373
Desviación estándar	3,610	1,106
Proporción de variación (%)	72,4	6,8
Proporción acumulada (%)	72,4	79,2

ANEXOS

Tabla S1, Total de individuos incluidos en el estudio correspondientes a 66 ejemplares colectados, 25 de ellos con voucher de audio, y 23 individuos a los que solo se les grabó el canto de anuncio (Total: 89), Los códigos de los voucher corresponden a MRC: Investigador Mauricio Rivera-Correa, NV: No Voucher, corresponden a individuos no colectados, *Vouchers que incluyen tanto medidas acústicas como medidas morfológicas,

Canto	Espécimen	Municipio	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (m s,n,m)
Tipo 1	MRC1714-18*	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 1	MRC1782-83	La Unión	Vereda La Cabaña	5,93875	-75,385816	2345
Tipo 1	MRC1564*	La Unión	Vereda La Cabaña	5,93875	-75,385816	2345
Tipo 1	MRC1779-80*	La Unión	Vereda La Cabaña	5,93875	-75,385816	2345
Tipo 1	MRC1833-35*	Medellín	Cerro Padre Amaya	6,2918684	-75,6726084	2650
Tipo 1	MRC1841	Medellín	Cerro Padre Amaya	6,2918684	-75,6726084	2650
Tipo 1	NV01-03	Medellín	Cerro Padre Amaya	6,2918684	-75,6726084	2650
Tipo 1	MRC1687	Sonsón	Vereda Roblalito	5,6958	-75,30405	2450
Tipo 1	MRC1688-89*	Sonsón	Vereda Roblalito	5,6958	-75,30405	2450
Tipo 1	NV04	Sonsón	Vereda Roblalito	5,6958	-75,30405	2450
Tipo 2	MRC1561	El Carmen de Viboral	Vereda La Chapa	6,03871	-75,318375	2530
Tipo 2	MRC1438	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	MRC1454	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	MRC1455*	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	MRC1456-60	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	MRC1723-25	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	MRC1788	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	NV06-07	El Carmen de Viboral	Vereda La Madera	6,032983	-75,3278	2670
Tipo 2	MRC1549	El Carmen de Viboral	Vereda La Rivera	6,091613	-75,306982	2250
Tipo 2	MRC1550	El Carmen de Viboral	Vereda La Rivera	6,091613	-75,306982	2250
Tipo 2	MRC1551*	El Carmen de Viboral	Vereda La Rivera	6,091613	-75,306982	2250
Tipo 2	MRC1552	El Carmen de Viboral	Vereda La Rivera	6,091613	-75,306982	2250
Tipo 2	MRC1776-77*	El Retiro	Don Diego	6,101361	-75,470083	2140
Tipo 2	MRC1774-75*	Rionegro	Vereda El Carmín	6,194167	-75,407755	2130
Tipo 2	NV05	Rionegro	Vereda Galicia	6,195275	-75,356635	2120
Tipo 2	NV08-11	Rionegro	Vereda Galicia	6,195275	-75,356635	2120
Tipo 3	MRC1778*	La Unión	Vereda La Cabaña	5,93875	-75,385816	2345
Tipo 3	MRC1784-85	La Unión	Vereda La Cabaña	5,93875	-75,385816	2345
Tipo 3	NV12-13	La Unión	Vereda La Cabaña	5,93875	-75,385816	2345
Tipo 3	MRC1215-16	Santa Rosa de Osos	Vereda Guanacas	6,7004417	-75,359627	2300
Tipo 3	MRC1240-41*	Santa Rosa de Osos	Vereda Guanacas	6,7004417	-75,359627	2300
Tipo 3	MRC1242-45	Santa Rosa de Osos	Vereda Guanacas	6,7004417	-75,359627	2300
Tipo 4	MRC1851*	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 4	MRC1937*	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 4	MRC1941	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800

Tipo 4	MRC1956	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 4	NV14-23	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1862	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1864	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1940	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1945-46	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1949-50	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1954-55	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1958*	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1959	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1961*	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800
Tipo 5	MRC1962	Valdivia	Vereda San Fermín	7,094899	-75,482269	1800

Tabla S2, Diferencias en las variables acústicas encontradas entre cada tipo de canto de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey HSD, En negrilla se resaltan variables en las que no existen diferencias significativas,

Prueba Tuckey HSD	Duración del canto (s)	Ancho de Banda (kHz)	Frecuencia mínima (kHz)	Frecuencia dominante (kHz)	Frecuencia máxima (kHz)	Notas / Canto	Duración de la nota (s)	Intervalo entre notas (s)
Tipos de canto	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
1-2	0	0	0	0	0	0,2175	0	0
1-3	0	0	0	0	1	0	0	0
1-4	0	0	0	0	0	0,0019	0	0
1-5	0	1	0	0	0	0,0404	0,9966	0
2-3	1	0,9509	0	0	0	0,0169	0	0,8121
2-4	0,9985	0,0975	0	0	0	0,3412	0,0057	0,0910
2-5	1	0	0,9965	0,9644	0,0167	0,3662	0	0
3-4	1	0,0824	0	0	0	0,3731	0	0,9057
3-5	1	0	0	0	0	0,9947	0	0,0078
4-5	0,9951	0,0170	0	0	0	0,9165	0,0928	0,0160

Tabla S3, Diferencias en las medidas morfométricas encontradas entre cada grupo, de acuerdo con el tipo de canto, en la prueba post hoc de Tukey HSD, En negrilla se resaltan variables en las que no existen diferencias significativas,

	LRC	AC	LC	DO	DON	DNR	DIN	DIO	DT	LAB	AAB	LM	LFM	LT	LTA	LP	ADIII	ADIV
Tipos de canto	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
1-2	0	0	0	0,0018	0	0,0135	0,2724	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-3	0	0	0	0	0	0	0,6548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-4	0	0	0	0,5790	0	0,0313	0,2548	0,0011	0,0067	0	0	0	0	0	0	0	0,0057	0,0146
1-5	0,0189	0,5448	0,9557	0,0461	1	0,0127	1	1	0	0,0087	0,0238	0,1112	0	0	0	0,0146	1	0,3884
2-3	0,0144	0,2915	0,0178	0,5526	0,9994	0,4659	0,9954	1	0,1305	0,8249	0,0018	0,0066	0,1733	0,1169	0,1270	0,1696	0,1343	0,0144
2-4	0,9196	0,9657	0,0051	0,9109	0,0195	0,7973	0,8924	0,9988	0,9604	0,8570	0,6511	0,9610	0,0371	0,0520	0,0280	0,0357	0,9619	0,9312
2-5	0,0025	0	0	0	0	0,9712	0,3289	0	0,9949	0,0304	0,0305	0	0,0022	0,0014	0,9725	0	0	0
3-4	0,6955	0,9704	0,5928	0,4083	0,0217	1	0,8086	1	0,9066	0,9987	0,7313	0,4943	0,6451	0,7926	0,6399	0,6404	0,2250	0,6735
3-5	0	0	0	0	0,0044	0,9047	0,6476	0	0,4323	0,0063	0	0	0	0	0,0826	0	0	0
4-5	0,0159	0,0027	0	0,0166	0	0,9675	0,2539	0,0035	0,9955	0,0468	0,0194	0	0	0	0,0178	0	0,0109	0

Tabla S4, Distancias genéticas no corregidas entre las cuatro entidades de *Pristimantis paisa* incluidas en el análisis filogenético y las especies más cercanamente relacionadas recuperadas en el análisis, La distancia genética está dada en porcentaje y basada en 630 sitios alineados de COI,

Especies	Distancias genéticas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 <i>Pristimantis paisa</i> C1 (16)	0 - 0,7								
2 <i>Pristimantis paisa</i> C2 (11)	15,7 - 17,6	0 - 1,5							
3 <i>Pristimantis paisa</i> C3 (8)	15,3 - 16,3	8,9 - 10,2	0 - 0,6						
4 <i>Pristimantis paisa</i> C5 (3)	17,2 - 17,7	16,1 - 17,2	15,5 - 15,9	0					
5 <i>Pristimantis</i> cf. <i>helvolus</i> (2)	17 - 17,7	14,6 - 15,9	14,8 - 15,3	9,4	0				
6 <i>Pristimantis palmeri</i> (3)	17,4 - 19,4	16,3 - 17,7	15,2 - 15,9	10,5 - 10,9	8,3 - 9,4	0,6 - 5,2			
7 <i>Pristimantis ptochus</i> (1)	13,3 - 13,7	13,5 - 14,8	13,7 - 14,2	17,2	15,5	16,5 - 16,6	0		
8 <i>Pristimantis zophus</i> (1)	15,5 - 16,1	13,7 - 14,8	12,9 - 13,3	16,1	16,3	16,1 - 16,3	13,5	0	

