

Universidad de Costa Rica  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología

Variación morfológica del complejo *pipiens* (Anura, Ranidae, *Lithobates*) en Costa Rica: implicaciones ecológicas y taxonómicas

Tesis de Licenciatura en Biología con énfasis en Zoología

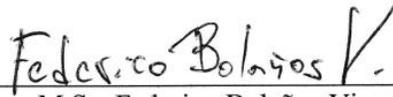
Yelma Pinto Valerín

A44052

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2016

Tesis sometida y aceptada por el tribunal del trabajo final de graduación como requisito para optar por el grado académico de Licenciada en Biología.



---

M.Sc. Federico Bolaños Vives  
Director de Tesis



---

M.Sc. Gerardo Chaves Cordero  
Lector



---

Ph.D. Gilbert Barrantes  
Lector



---

Ph.D. Luis Sandoval Vargas  
Miembro extra del tribunal

---

Dr. Javier Trejos Zelaya  
Presidente del Tribunal

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primera instancia a mis padres Alberto Pinto y Tere Valerín quienes me apoyaron en este proceso no solo económicamente, sino emocionalmente e incluso a muestrear en un par de ocasiones. Sin su ayuda este trabajo no habría sido posible.

Agradezco a Federico Bolaños quien ha sido mi profesor en muchas ocasiones y quien además es mi tutor de tesis, fue quien me orientó con la selección del tema. Además quiero agradecer a mis lectores Gilberth Barrantes por sus aportes y sugerencias para el trabajo y a Gerardo Chaves por su ayuda con la estadística, aportes, sugerencias y por tenerme tanta paciencia en este proceso. Agradezco también a Luis Sandoval y al decano de la facultad de ciencias Javier Trejos por sus comentarios para mejorar el trabajo.

Agradezco a Juan Ignacio Abarca por su ayuda en los muestreos. A la Universidad para la paz por permitirme trabajar en sus instalaciones. A la estación Biológica las Cruces por su diligencia con los permisos de trabajo. A la gente del SINAC por su colaboración para los permisos de colecta.

Gracias a todos.

# Índice general

Agradecimientos .....	ii
Índice general.....	iii
Lista de cuadros .....	iv
Lista de Figuras.....	v
Resumen.....	vii
I. Introducción.....	1
1.1 Marco Teórico.....	1
1.2 Antecedentes .....	4
1.3 Justificación .....	8
II. Objetivos .....	9
2.1 Objetivo general.....	9
2.1.1 Objetivos específicos .....	9
III. Metodología.....	10
3.1 Especie de interés: <i>Lithobates taylori</i> y <i>Lithobates forreri</i> (Subgrupo <i>berlandieri</i> , Familia Ranidae).....	10
3.2 Muestreo y recolección de datos.....	12
3.3 Análisis estadístico .....	16
IV. Resultados.....	18
V. Discusión.....	27
VI. Conclusiones.....	32
VI. Referencias .....	33

## Lista de cuadros

<b>Cuadro I.</b> Promedios, desviaciones estándar, máximos y mínimos para las variables continuas del grupo <i>pipiens</i> separado según zonas geográficas.....	18
<b>Cuadro II.</b> Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación de las zonas bajas entre vertientes: zonas bajas de la zona norte contra zonas bajas del Pacífico Norte y zonas bajas del Pacífico Central.....	20
<b>Cuadro III.</b> Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación entre zona alta de Talamanca (ZAT) y Zona alta de la cordillera volcánica central (ZACVC), además de la comparación entre la zona alta de Talamanca (ZAT) y la zona alta del pacífico sur (ZAPS).....	21
<b>Cuadro IV.</b> Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación del Valle Central contra zonas bajas (ZBZN, ZBPN, ZBPC) y contra zonas altas (ZAT, ZACVC, ZAPS).....	22
<b>Cuadro V.</b> Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación entre zonas bajas (ZBZN, ZBPN, ZBPC y VC) y zonas altas (ZAT, ZACVC y ZAPS).....	22

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Árbol filogenético de máxima probabilidad para Rana de Hillis y Wilcox (2005). El análisis se realizó con 2Kb del ADN mt de las regiones 12S y 16 S.....7
- Figura 2.** Vista dorsal a) *Lithobates taylori* con pliegues dorsales continuos b) *Lithobates forreri* con pliegues dorsales discontinuos.....10
- Figura 3.** Sitios de colecta Mapa del grupo *pipiens* para Costa Rica según la zona geográfica.....13
- Figura 4.** Características morfológicas para anfibios a) vista dorsal de la cabeza y b) perfil del hocico.....14
- Figura 5.** Medidas tomadas a los ejemplares del grupo *pipiens* para Costa Rica, a)medidas tomadas en la cabeza: largo de la cabeza (LC), diámetro del tímpano (DT), diámetro del ojo (DO), distancia entre la narina y el ojo (N-O), ancho de la cabeza (AC), distancia entre narinas (N-N) y distancia interorbital (DOI). b) Medidas tomadas en el cuerpo: longitud hocico-ano (LHA), longitud del radio (LR), longitud del húmero (LH), longitud del fémur (LF), longitud de la tibia (LT), longitud del calcáneo (LCal). C) Medida del tercer dedo de la mano (3DM). d) Medida del cuarto dedo del pie (4DP). e) Medidas de las partes bucales: distancia entre coanas (Dist C-C), diámetro de coanas (DC) y diámetro de los dientes (DD).....15
- Figura 6.** Análisis de componentes principales de las variables continuas medidas para el grupo *pipiens* en Costa Rica. En tonos rojos y morados se observan las zonas bajas y en tonos de azules se encuentran las zonas altas.....18
- Figura 7.** Diagrama de cajas que presenta la mediana (los puntos), el máximo y mínimo (bigotes) y los cuartiles (cajas verdes) para cada variable continua según la zona de colecta. ....23
- Figura 8.** Porcentaje de la presencia y ausencia de los sacos vocales en los machos del grupo *pipiens* para Costa Rica según zonas altas y zonas bajas.....25
- Figura 9.** Porcentaje de las distintas formas del contorno del hocico de los individuos del grupo *pipiens* para Costa Rica según zonas altas y zonas bajas.....26

**Figura 10.** Cantidad de lagunas según la altitud, calculado con base en el mapa de lagunas de Costa Rica, tomado del Atlas digital de Costa Rica con una escala 1/ 50 000.....28

## Resumen

El grupo *pipiens* del género *Lithobates* perteneciente a la familia Ranidae, está representado en Costa Rica por *Lithobates taylori* y *Lithobates forreri*. Este grupo es considerado taxonómicamente complejo ya que las especies que lo componen son muy parecidas morfológicamente, además de usar los mismos hábitats reproductivos. Se ha establecido que existe una única especie del grupo *pipiens* por cada vertiente en Costa Rica, definidas por la diferencia en las líneas dorsales continuas en el caso de *L. taylori* en el Atlántico y discontinuas para *L. forreri* en el Pacífico. Además se han propuesto hasta siete posibles especies, la mayor parte de ellas ubicadas en las zonas montañosas, con base en la variación morfológica observada en algunas poblaciones. Sin embargo hasta el momento no se ha realizado un análisis morfológico amplio de las distintas poblaciones del país para comprobar la veracidad de estas hipótesis taxonómicas. El objetivo de este trabajo fue determinar los patrones de distribución de la variabilidad morfológica del grupo *pipiens* en varias poblaciones presentes en nuestro país, y relacionarlos con los patrones de especiación propuestos para el grupo en Costa Rica. Se encontraron dos grupos bien definidos morfológicamente, uno en zonas bajas y otro en zonas altas. Los cambios morfológicos más importantes están relacionados con el tamaño corporal. Las poblaciones de las zonas bajas son más grandes que las poblaciones de zonas altas. Las características cualitativas no presentaron ningún patrón de distribución particular. Además no se encuentra evidencia que respalde la segregación de las especies por vertientes y por región montañosa. Podría concluirse que como las variaciones más importantes entre poblaciones

están relacionadas con el tamaño corporal, es posible que el patrón de distribución observado esté más relacionado con variaciones ecológicas (como por ejemplo la temperatura) más que con diferencias taxonómicas. Sin embargo dado que existen al menos una población representativa del morfo de zonas bajas en altitudes intermedias y una población del morfo de zonas altas en zonas bajas de la vertiente Caribe, es posible que existan al menos dos especies del grupo *pipiens* en el país, pero con una distribución diferente a la propuesta actualmente. Por último, dada la gran variación de los caracteres cualitativos y cuantitativos que no sigue un patrón particular entre las diferentes poblaciones, podría concluirse que efectivamente el complejo *pipiens* está compuesto de especies crípticas y se requieren análisis moleculares a lo largo de su distribución para resolver el número de especies que realmente lo componen.

# **I. Introducción**

## **1.1 Marco Teórico**

El concepto de especie es considerado como una de las unidades fundamentales de la biología (de Queiroz 2007, Sites y Marshall 2003), siendo de vital importancia para estudios en ecología, evolución, sistemática y biología de la conservación (Sites y Marshall 2004). En las últimas décadas han surgido muchas definiciones de especie que son parcialmente incompatibles entre ellas, lo que provoca que se lleguen a diferentes conclusiones acerca de los límites entre especies y el número de estas (de Queiroz 2007, Pigliucci 2003).

De Queiroz (1998) define el concepto de especie como un linaje que se ha separado de otros linajes, abarcando conceptos como especies filogenéticas y otras similares. De esta manera se resuelve la paradoja de la definición de especie, utilizando argumentos denominados criterios de especie para probar que los linajes se han separado.

La variación morfológica dentro de una especie o un complejo de especies puede estar relacionada con la heterogeneidad del ambiente (Uribe *et al.* 2007, Camero-R 2003, Badyaev 1997). Esta heterogeneidad ambiental esta compuesta por características físicas como la temperatura, precipitación o presión atmosférica, los cuales están asociados entre otras cosas a la altitud (Cortez-Fernandez 2006, Marquis y Miaud 2008). Esta variación en el fenotipo como respuesta al ambiente se llama plasticidad, la cual se manifiesta con cambios fisiológicos, de conducta o morfológicos (Guantay *et al.* 2013). Debido a esto

muchas especies presentan características que se gradúan (forma A en un extremo de distribución, forma B en el otro extremo y un gradiente entre ambos) a lo largo de la distribución, dado el cambio en las condiciones ambientales (Baraquet *et al.* 2012).

En el caso de los anfibios, los estudios que han sido basados en características morfológicas han permitido explicar las relaciones evolutivas, taxonómicas y filogenéticas entre ellos, para un mismo o diferentes niveles taxonómicos (Baraquet *et al.* 2012). Cuando hay adaptación local, los organismos que se desarrollan en ambientes similares tienden a desarrollar fenotipos similares (Kawecki y Ebert 2004). Hay muchas características morfológicas que varían con la altura y se pueden encontrar varios ejemplos de diversos organismos con estas variaciones morfológicas. Como en el caso de un estudio de pinzones carduelinos se compararon en sus características reproductivas en veintitrés pares de especies cercanamente emparentados. A mayor altitud veinte parejas tuvieron nidos más pequeños, para otras siete parejas las nidadas fueron más pequeñas y en doce parejas los tiempos de incubación fueron mayores (Badyaev 1997).

Estos cambios morfológicos relacionados con la altitud también se pueden ver en la salamandra *Euproctus asper* se encuentra una relación positiva entre el largo del cuerpo y la longitud de la cola con la altitud. Además esta relación es mayor en el caso de las hembras de esta salamandra (Guerrero-Campo 1995). El tamaño corporal y la puesta de huevos de *Bufo gargarizans* aumentan con la elevación (Liao y Lu 2012). Los individuos de *Rhacophorus omeimontis* tienen una correlación positiva entre la edad máxima alcanzada y la altitud en que viven (Liao y Lu 2012). Además los machos de esta especie a

mayores alturas son significativamente más grandes que los de menores alturas, sin embargo este patrón no se obtuvo para las hembras (Liao y Lu 2011).

En Costa Rica tenemos una geografía muy variada que propicia gran diversidad de ambientes y por ende debe influir en la variación morfológica de las especies. Se destacan cuatro cadenas montañosas que cruzan al país en dirección noroeste- sureste, la cual actúa de divisora de aguas, propiciando climas lluviosos en el Caribe y climas secos en el Pacífico Norte (Castillo-Muñoz 1991). El ámbito altitudinal varía de 0 a 3819 m, lo que permite la formación de gran variedad de zonas climáticas asociadas a los pisos basal, premontano y montano (Coen 1991). Además de la variación ambiental y altitudinal está el hecho de que varios grupos de vertebrados acuáticos y terrestres presentan cambios morfológicos según la vertiente en la que se encuentran (Bussing 1998, Savage 2002), resultando que algunas especies tienen poblaciones con individuos de mayores tamaños en alguna de las vertientes (Duellman 1970) o en zonas bajas.

El levantamiento de la cordillera de Talamanca dividió la herpetofauna de zonas bajas en ensamblajes diferenciados (Savage 2002). Hoy en día muchas especies sólo se distribuyen en una vertiente, mientras que en la vertiente opuesta se presenta una especie muy parecida pero se diferencia por unos pocos rasgos morfológicos o de coloración. Sin embargo el paso de especies de herpetofauna entre vertientes es un hecho conocido (Crawford *et al.* 2003) para Costa Rica. Además la presencia del bosque seco (Crawford *et al.* 2007) y otras barreras físicas poco estudiadas como el cauce de grandes ríos parecen incidir en la variación morfológica a lo largo de cada vertiente (Arias *et al.* 2016).

## 1.2 Antecedentes

La familia Ranidae en América está compuesta por cinco grupos (grupo de especies de un mismo género más relacionadas entre sí que con otros miembros del género) del género *Lithobates*: *catesbiana*, *palmipes*, *tarahumarae* y *pipiens*, este último tiene tres subgrupos: *montezumae*, *aerolata* y *berlandieri* (Hillis y Wilcox 2005, Hillis y de Sá 1988, Acosta-Galvis 1999). Otros autores refuerzan esta misma clasificación pero agregan un grupo más: *sylvaticus* (Yuan *et al.* 2016). Las primeras clasificaciones del grupo *pipiens* empiezan con Cope (1889) que dividió las poblaciones estadounidenses en tres subespecies, *Lithobates pipiens pipiens*, *L. p. brachycephala* y *L. p. sphenoccephala*. Posteriormente Dickerson (1906) reconoce a nivel de especies *L. sphenoccephala* y *L. pipiens*. Sin embargo considera que es imposible diferenciar entre *L. p. pipiens* y *L. p. brachycephalus* por lo que las unifica. No obstante indica que con un mayor trabajo sistemático que el realizado hasta ese momento posiblemente se puedan establecer otras variantes.

Moore (1975) resume ampliamente todo la historia de la sistemática del grupo *pipiens* durante la primera mitad del siglo XX, discutiendo la pertinencia, según las teorías evolutivas en boga en su momento, de los grupos y especies reconocidas. Además realizó una serie de experimentos donde propone que las especies que están más cercanamente emparentadas generaran híbridos normales y los que se encuentran emparentados de manera lejana tendrían híbridos defectuosos. El cruzó ejemplares usando hembras de Vermont (Estados Unidos) con espermatozoides de machos desde Estados Unidos hasta el sur de

Costa Rica dando cruces viables, solo cuando el esperma venía de las costas del Golfo de México, el cruce no era viable. Por lo que basado en esto el propone que hay una serie de poblaciones que se encuentran muy relacionadas y no deberían separarse en varios grupos.

Taylor (1952) propone dos especies del grupo *pipiens* para Costa Rica, *L. pipiens* y *Lithobates maculatus*, basado en análisis morfológicos. En la fecha de esta publicación ya había sido descrita *Lithobates forreri* por Boulenger en 1883, sin embargo no utiliza este nombre para Costa Rica. También indica que ambas especies se ven muy similares pero que difieren en los hábitos generales, detalles de la coloración, ausencia de los sacos vocales laterales y diferencias en los tamaños de coanas y dientes. Para la descripción de *L. taylori* utilizó un espécimen colectado en Peralta de Cartago, el cual no se diferenciaba morfológicamente de las poblaciones localizadas en el premontano de Turrialba y en el pemontano alto y montano de la parte oeste de la Cordillera Volcánica Central.

Smith (1959) determina que el espécimen de *L. maculatus* encontrado en Costa Rica realmente es una especie nueva y le asigna el nombre de *Lithobates taylori*. Sin embargo no presenta más características diagnósticas que las que presentó Taylor. Posteriormente Hillis (1988) establece que la población costera de la vertiente Pacífica es *L. forreri*, descrita por Boulenger (1883) con un espécimen colectado en México, pues la primera especie del grupo es la más norteña en distribución y las últimas dos especies están distribuidas en la vertiente Atlántica. Además al realizar una revisión de la sistemática del grupo *pipiens* se discute que todos los análisis morfológicos, de vocalización, de zonas de contacto, de mecanismos de aislamiento, cariológicos, de cruces en laboratorio y

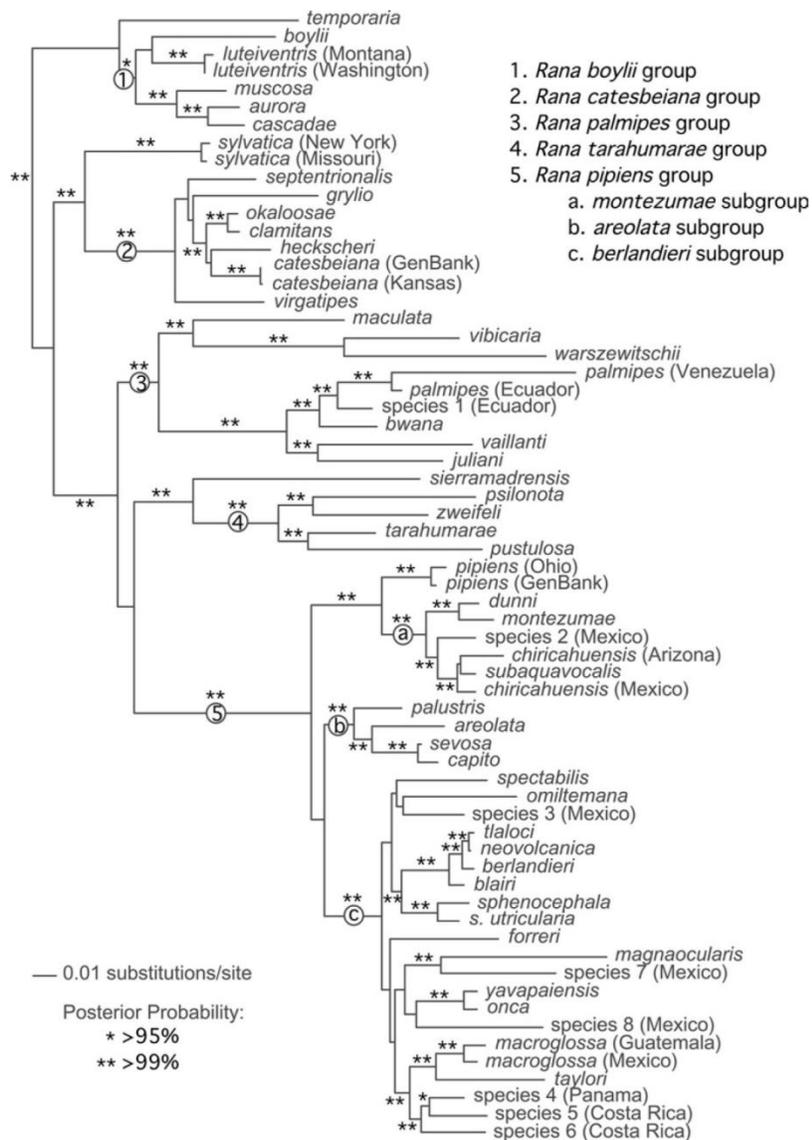
biomoleculares sustentan que a pesar de la conservación morfológica el complejo *pipiens* se compone de al menos 27 especies.

Para Costa Rica Savage (2002) reconoce dentro de la familia Ranidae dos especies del grupo *pipiens*, *L. forreri* y *L. taylori*. Savage (2002) asocia a *L. taylori* a la vertiente Caribe y zonas altas, mientras que a *L. forreri* con la vertiente Pacífico y zonas bajas. Sin embargo menciona que las poblaciones del Valle Central (menos de 1700 m), Cordillera Volcánica Central (1500-1862 m), la cordillera de Talamanca (1700-3200 m) y Pacífico Sur son poblaciones que él observa diferentes entre sí por lo que propone que pueden ser especies diferentes (Savage 2002). Sin embargo no hay ningún estudio formal que apoye o descarte estas variaciones poblacionales propuestas por Savage.

Analizando la filogenia propuesta por Hillis y Wilcox (2005) y construido con información molecular (**Fig.1**), se muestra que *L. taylori* de la vertiente Caribe de Nicaragua es diferente a *L. taylori* de zonas altas de Costa Rica. Dado que ambos países comparten condiciones similares a lo largo de la costa caribeña y que la especie fue descrita con un ejemplar de Costa Rica quedaría en duda la presencia de *L. taylori* en Nicaragua. Esto implicaría que en la vertiente Caribe podrían ocurrir dos especies, una para zonas bajas de la zona Norte y posiblemente otras regiones bajas de esta vertiente y *L. taylori* para zonas altas más una población de zonas bajas en la región de Peralta, Turrialba, según la descripción inicial que realizó Taylor (1952).

En este trabajo de Hillis y Wilcox (2005) también se destaca que las poblaciones mexicanas de *L. forreri* son taxonómicamente diferentes a la población del Pacífico Central de Costa Rica (Barranca, Puntarenas, sp 6 del árbol filogenético), por lo que se puede

sugerir que *L. forreri* no se encuentra en Costa Rica (**Fig. 1**). La relación taxonómica entre las poblaciones de zonas bajas de ambas vertientes para Costa Rica, independiente del nombre que se les puede asignar, no se ha investigado.



**Fig. 1.** Árbol filogenético de máxima probabilidad para el género *Rana* del nuevo mundo, basado en análisis de ADN r.

\*Tomado de Hillis y Wilcox (2005).

### 1.3 Justificación

Siguiendo a Savage (2002) queda establecido que la distribución de las especies del grupo *pipiens* en Costa Rica está definida por la separación de vertientes y las poblaciones montanas podrían corresponder a una o varias especies no descritas aún. Sin embargo hay muchas especies de anfibios que son capaces de pasar de una vertiente a otra en nuestro país. Tenemos el ejemplo de *Incilus coccifer* y *Engystomops pustulosus* las cuales son típicas de la Vertiente Pacífica, pero se han encontrado poblaciones en el Caribe. También se da el caso contrario donde especies típicas de la vertiente Caribe se han encontrado en el Pacífico como *Basiliscus vittatus* en Esparza y *Bolitoglossa lignicolor* en Barranca (Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica, Gerardo Chaves comunicación personal).

El género *Lithobates*, debido a su amplia distribución altitudinal es un candidato para ampliar su distribución entre vertientes. Se hace necesario por lo tanto hacer una revisión morfológica de las poblaciones de ambas vertientes en el país para clarificar si esta división por vertientes es suficiente para la separación de ambas especies. Sumado a esto tenemos que las características morfológicas usadas para diferenciar ambas especies del grupo *pipiens* en Costa Rica son escasas y en algunos casos ambiguas. Por ejemplo Taylor (1952) no explica cómo se tomaron las medidas de las partes bucales o de las coanas, por lo que son difíciles de replicar en cualquier otro espécimen.

Savage (2002) propone como característica principal para separar estas dos especies la continuidad o discontinuidad de los pliegues dorsales, sin embargo esta característica y

otras sugeridas por Taylor (1952) no han sido evaluadas en distintas poblaciones del país para poder establecer su valor taxonómico. Además tenemos los resultados de la filogenia de Hillis y Wilcox (2005), que da evidencia de que las especies no se encuentran distribuidas como se pensaba y posiblemente no corresponden con el nombre propuesto. Por lo tanto se hace necesario hacer la evaluación morfológica correspondiente para determinar el valor de los caracteres hasta ahora usados para definir las especies del grupo *pipiens* en el país y establecer si las poblaciones evaluadas de cada especie se distribuyen según ha sido establecido por Savage (2002).

## **II. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Determinar la distribución de las especies del grupo *pipiens* (Ranidae) para Costa Rica, basada en el análisis de los caracteres morfológicos.

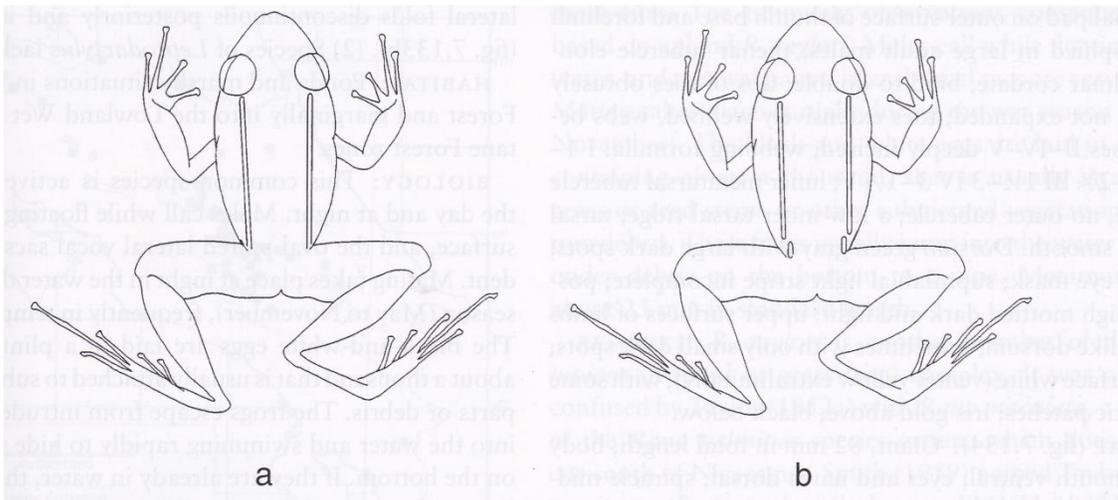
#### **2.1.1 Objetivos específicos**

1. Determinar si los caracteres morfológicos que se usan para separar *L. taylori* y *L. forreri* para Costa Rica son consistentes a lo largo de su distribución.
2. Comparar el patrón de distribución de los caracteres morfológicos que separan las especies del grupo *pipiens* para Costa Rica contra las distribuciones propuestas para estas especies por Savage (2002) y la filogenia propuesta por Hillis y Wilcox (2005).

### III. Métodos

#### 3.1 Especie de interés: *Lithobates taylori* y *Lithobates forreri* (Subgrupo *berlandieri*, Familia Ranidae).

En Costa Rica hay cinco especies pertenecientes a la familia Ranidae, las dos especies de estudio se encuentran en el subgrupo *berlandieri* y en el grupo *pipiens* (Frost *et al.* 2006). En Costa Rica *L. forreri* es la especie más cercana filogenéticamente a *L. taylori* y la diferencia morfológica más evidente son un par de pliegues dorsales longitudinales continuos (Savage 2002), ya que en el caso de *L. forreri* se produce un quiebre en el pliegue en la parte posterior (**Fig. 2**).



**Fig. 2.** Vista dorsal a) *Lithobates taylori* con pliegues dorsales continuos y b) *Lithobates forreri* con pliegues dorsales discontinuos.

\*Imagen tomada de Savage 2002.

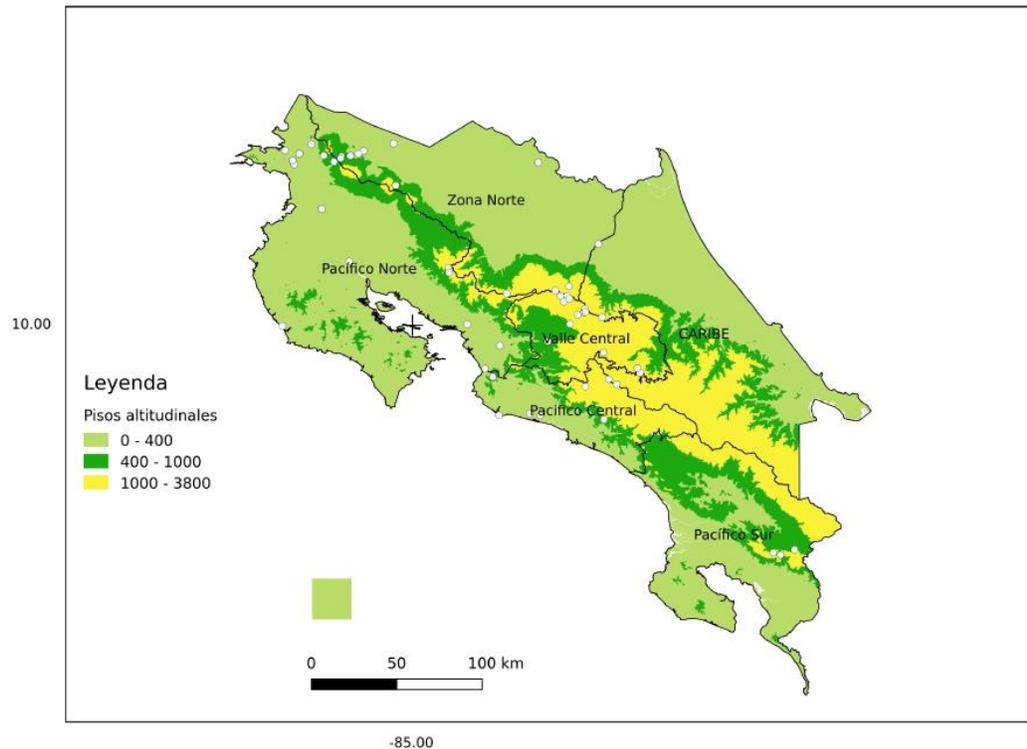
*Lithobates taylori* se encuentra activa tanto de día como de noche, se reproducen durante las noches durante la época de lluviosa, los machos cantan flotando desde el agua, presentan sacos vocales dobles y los huevos son blancos con negro que se depositan en grandes cantidades bajo el agua sujetos a la vegetación (Savage 2002). *Lithobates taylori* se encuentra en alturas superiores a 1100 m, a lo largo de la vertiente Caribe, es nativa de Costa Rica y Nicaragua, se puede encontrar en localidades del premontano húmedo y montano bajo, en la meseta oriental, occidental y la cordillera Volcánica Central (Bolaños *et al.* 2008, Savage 2002). Esta especie se encuentra catalogada como de preocupación menor y su mayor amenaza es la pérdida del hábitat principalmente por la contaminación de agua y la deforestación (Bolaños *et al.* 2008).

*Lithobates forreri* se encuentra activa tanto de día como de noche, se reproducen durante las noches durante la época de lluviosa, los machos cantan flotando desde el agua, presentan sacos vocales dobles y los huevos son blancos con negro que se depositan en grandes cantidades bajo el agua sujetos a la vegetación (Savage 2002). *Lithobates forreri* está asociada a alturas menores (0 a 1300 m) siempre en un ambiente de alta humedad (Santos-Barrera *et al.* 2008). *Lithobates forreri* se encuentra desde México hasta Costa Rica, se ubican en tierras bajas del bosque tropical y bosque estacional tropical, necesitan pozas ó lagunas permanentes para reproducirse (Santos-Barrera *et al.* 2008, Savage 2002). Se encuentra catalogada como de preocupación menor (Santos-Barrera *et al.* 2008).

### 3.2 Muestreo y recolección de datos

Para determinar si las especies del grupo *pipiens* (*L. taylori* y *L. forreri*) en Costa Rica se pueden diferenciar morfológicamente, se midieron 128 individuos adultos. Se analizaron 62 especímenes de *L. forreri*, 25 de *L. taylori* y 41 individuos que aún no habían sido clasificados. La mayor parte de los especímenes provienen de la colección herpetológica del museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica de donde se midieron 96 individuos. Además se realizaron colectas en sitios de interés (lugares, que según Savage, podrían haber poblaciones diferenciadas y de los que no se tenían individuos colectados) como San José de la Montaña donde se colectaron 11 individuos, Cerro Paraguas en San Vito de Coto Brus donde se colectaron 12 individuos y en la Zona de El Rodeo en Ciudad Colón donde se colectaron 9 individuos. Todos los especímenes colectados fueron depositados en el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica.

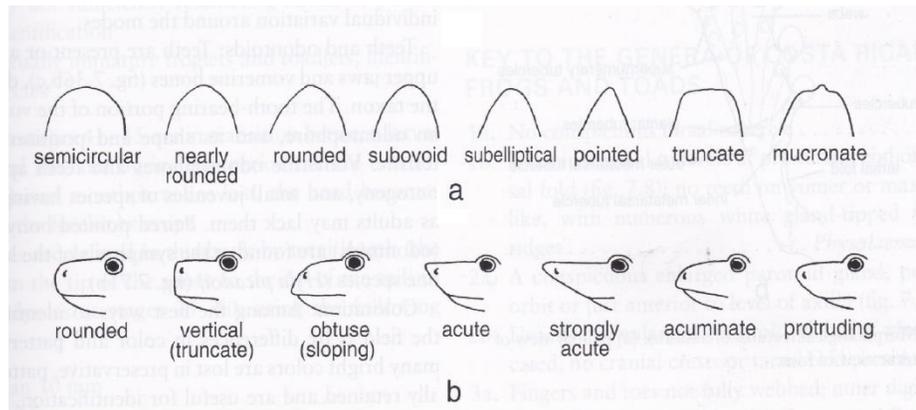
Las poblaciones se clasificaron hasta los 850 m en zonas bajas y de 850 m en adelante en zonas altas. Por lo que las zonas se definieron en zonas bajas de la Zona Norte (ZBZN), zonas bajas del Pacífico Norte (ZBPN), zonas bajas del Pacífico Central (ZBPC), zonas altas del Pacífico Sur (ZAPS), zonas altas de Talamanca (ZAT), zonas altas de la cordillera Volcánica Central (ZACVC) y Valle Central (VC) (**Fig.3**). Para esta clasificación se usaron las regiones climáticas de Costa Rica (Instituto Meteorológico de Costa Rica).



**Fig. 3.** Sitios de colecta del grupo *pipiens* para Costa Rica según la zona geográfica.

Se consideró como individuos adultos a los machos que midieran más de 6 cm de longitud hocico-ano y presentaran caracteres sexuales secundarios como las excrescencias nupciales y los sacos bucales evidentes. Por su parte se consideró como hembras adultas los individuos que midieran más de 7 cm y no tuvieran caracteres sexuales secundarios masculinos Savage (2002). Para cada individuo se anotó la coloración del dorso, los muslos, el vientre y la región gular, los colores fueron registrados sobre un fondo blanco, cuando los individuos ya estaban preservados. También se anotó la continuidad de las líneas dorsales, la presencia de los sacos vocales, la textura de la piel (lisa o rugosa, vista en

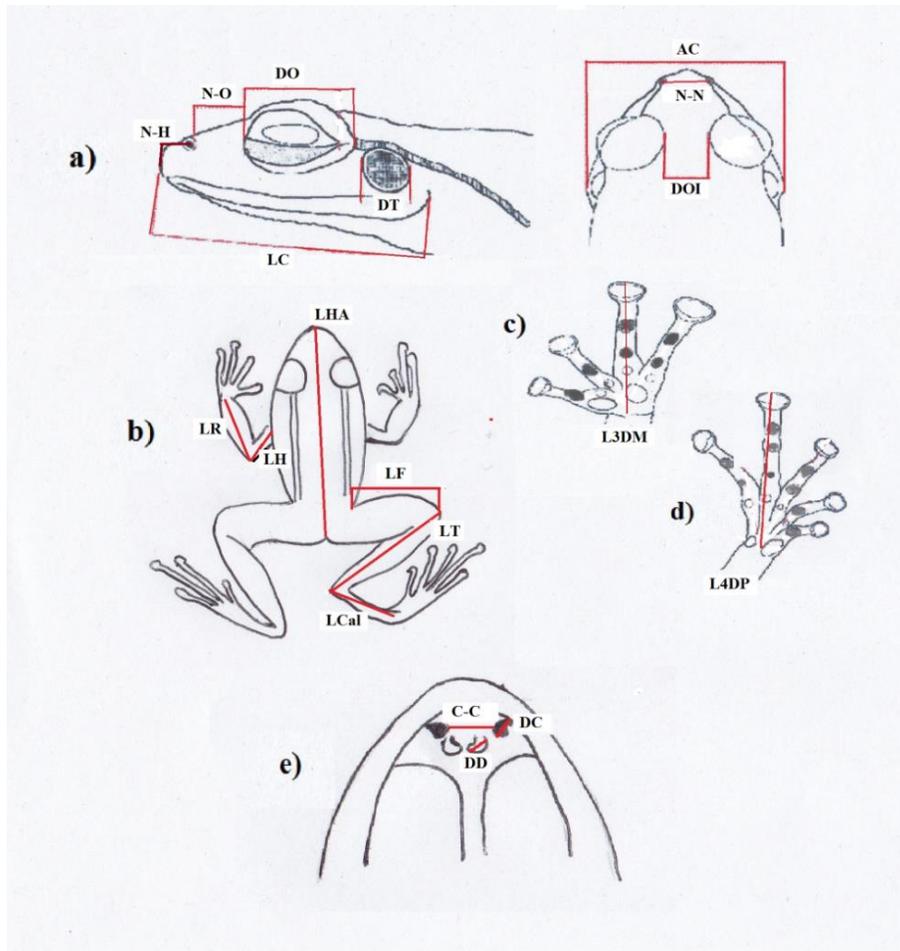
el estereoscopio) y el tipo de contorno del hocico desde una vista dorsal de la cabeza (**Fig. 4a**) y el perfil del hocico (**Fig. 4b**).



**Fig. 4.** Características morfológicas para anfibios: a) vista dorsal de la cabeza y b) perfil del hocico.  
\*Tomado de Savage (2002).

Las medidas morfométricas se tomaron con un Pie de Rey, en centímetros con dos decimales y una incertidumbre de  $\pm 0,01$  mm. Se tomaron estas medidas ya que se realiza un trabajo morfológico y solo utilizando todas las medidas del cuerpo se puede determinar si hay diferencias entre ambas poblaciones que sirvan para diferenciar a *L. taylori* y a *L. forreri*: la longitud hocico-ano (LHA), ancho de la cabeza (justo en la articulación de la mandíbula, AC), longitud de la cabeza (de la articulación de la mandíbula al hocico, LH), diámetro del tímpano (DT), diámetro del ojo (derecho, DO), distancia entre narinas (N-N), distancia interorbital (DOI), distancia narina-ojo (N-O), distancia narina- hocico (N-H), diámetro de los dientes (DD), diámetro de las coanas (DC), distancia entre coanas (C-C), diferencia del tamaño de las coanas y los dientes (diámetro de las coanas/ diámetro de los dientes), longitud del radio (LR), longitud del húmero (LH), cantidad de tubérculos

subarticulares, tubérculo tenar , tubérculo palmar, longitud del tercer dedo de la mano (L3DM), pliegue en el borde de los dedos, longitud de la tibia (LT), longitud del fémur (LF), longitud del calcáneo (LCal), longitud del cuarto dedo del pie (L4DP) (**Fig 5**).



**Fig. 5.** Medidas tomadas a los individuos del grupo pipiens para Costa Rica a) Medidas tomadas a la cabeza: ancho de la cabeza (justo en la articulación de la mandíbula, AC), longitud de la cabeza (de la articulación de la mandíbula al hocico, LH), diámetro del tímpano (DT), diámetro del ojo (derecho, DO), distancia entre narinas (N-N), distancia interorbital (DOI), distancia narina-ojo (N-O), distancia narina- hocico (N-H). b) Medidas tomadas al cuerpo: la longitud hocico-ano (LHA), longitud del radio (LR), longitud del húmero (LH), cantidad de tubérculos subarticulares, tubérculo tenar , tubérculo palmar, pliegue en el borde de los dedos, longitud de la tibia (LT), longitud del fémur (LF), longitud del calcáneo (LCal). c) Medida del tercer dedo de la mano (L3DM). d) Medida del cuarto dedo del pie (L4DP). e) Medidas de las partes bucales: diámetro de los dientes (DD), diámetro de las coanas (DC), distancia entre coanas (C-C), diferencia del tamaño de las coanas y los dientes (diámetro de las coanas/ diámetro de los dientes).

### 3.3 Análisis estadístico

Se calculó el promedio, la desviación estándar y el mínimo y máximo de cada variable morfológica para cada clasificación. Las variables morfométricas fueron transformadas para eliminar los efectos alométricos del tamaño del cuerpo y la forma descrito en Leonart *et al.* (2000). En este método se realiza una transformación logarítmica a las variables continuas para reducir los valores extremos. Todas las variables transformadas se usan en la transformación alométrica por medio de la ecuación  $Y_i^* = Y_i \left[ \frac{X_0}{X_i} \right]^b$ , en donde  $Y^*$  es el valor de la variable dependiente ((AC, LH, DT, DO, N-N, DOI, N-O, N-H, DD, DC, C-C, LR, LH, L3DM, LT, LF, LCal y L4DP) corregida por tamaño y forma,  $Y_i$  corresponde al valor de cada una de las variables morfométricas dependientes,  $X_0$  es el promedio de la variable LHA para todas las poblaciones,  $X_i$  es el valor de LHA para cada individuo y  $b$  es la intercepción de la línea de regresión con el eje Y resultante de la regresión de cada variable dependiente con  $X_0$ . La intercepción se usa como como factor de transformación alométrica y es único para cada variable.

Para determinar el patrón de distribución de los caracteres morfológicos entre las distintas poblaciones se hizo un análisis de componentes principales (PCA) para las variables continuas ya transformadas (LHA, AC, LH, DT, DO, N-N, DOI, N-O, N-H, DD, DC, C-C, LR, LH, L3DM, LT, LF, LCal y L4DP) (biblioteca prcomp del proyecto R). El PCA muestra una segregación de las poblaciones evaluadas, una población de zonas bajas y otra población de zonas altas. Este patrón de zonas bajas y zonas altas se probó mediante un análisis discriminante lineal (biblioteca LDA del proyecto R). Para esto se creó una

nueva variable categórica que agrupa las distintas poblaciones según el patrón obtenido del PCA: zonas bajas y zonas altas. Se separó un 80% de los datos (muestra de adiestramiento) para hacer el modelo discriminante y el 20% restante (muestra experimental) se utilizó para probar el modelo. El modelo se probó 25 veces para registrar el promedio de los aciertos a la hora de clasificar los datos en las categorías evaluadas.

Las variables continuas ya transformadas además fueron comparadas entre las poblaciones por medio de un ANDEVAM, después de determinar que los residuos cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk,  $\alpha = 0.05$ ). Se utilizó el Factor de inflación de la varianza (biblioteca VIF del proyecto R) para eliminar las variables con una colinialidad mayor al 70%, quedando solo 10 variables dependientes para el análisis: largo de la cabeza (LC), Diámetro del ojo (DO), distancia interorbital (DO I), distancia narina- hocico (N-H), diámetro coanas (DC), diámetro de dientes (DD), distancia entre coanas (C-C), longitud del húmero (LH), longitud del fémur (LF) y longitud del 4 dedo de la pata (L4DP). Las variables independientes son las zonas de clasificación.

En el ANDEVAM se realizaron una serie de contrastes para probar las diferentes distribuciones propuestas. Para determinar si la distribución del grupo *pipiens* está determinada por vertiente, se contrastó zonas bajas de la vertiente Caribe (ZBZN) contra zonas bajas de la vertiente Pacífica (ZBPN y ZBPC). Para evaluar las posibles poblaciones sugeridas por Savage (2002) se contrastó la zona alta de Talamanca (ZAT) contra las zona alta de la Cordillera Volcánica Central (ZACVC) y contra la zona alta del Pacífico Sur (ZAPS), además de contrastar el Valle Central (VC) contra las zonas bajas (ZBZN, ZBPN y ZBPC) y contra las zonas altas (ZAT, ZACVC y ZAPS). También se contrastó el patrón

encontrado en el PCA, zonas bajas (ZBZN, ZBPN, ZBPC y VC) contra las zonas altas (ZAT, ZACVC y ZAPS).

Para las variables cualitativas se calculó la proporción de cada una de ellas para zonas bajas y zonas altas. Las proporciones se compararon con una prueba de verosimilitud. Sin embargo esto no se realizó para la coloración de los muslos (manchas cafés sobre fondo blanco), la textura de la piel (lisa) ni para la presencia ausencia de los tubérculos palmares (presentes), ya que estas características fueron iguales para todos los individuos medidos.

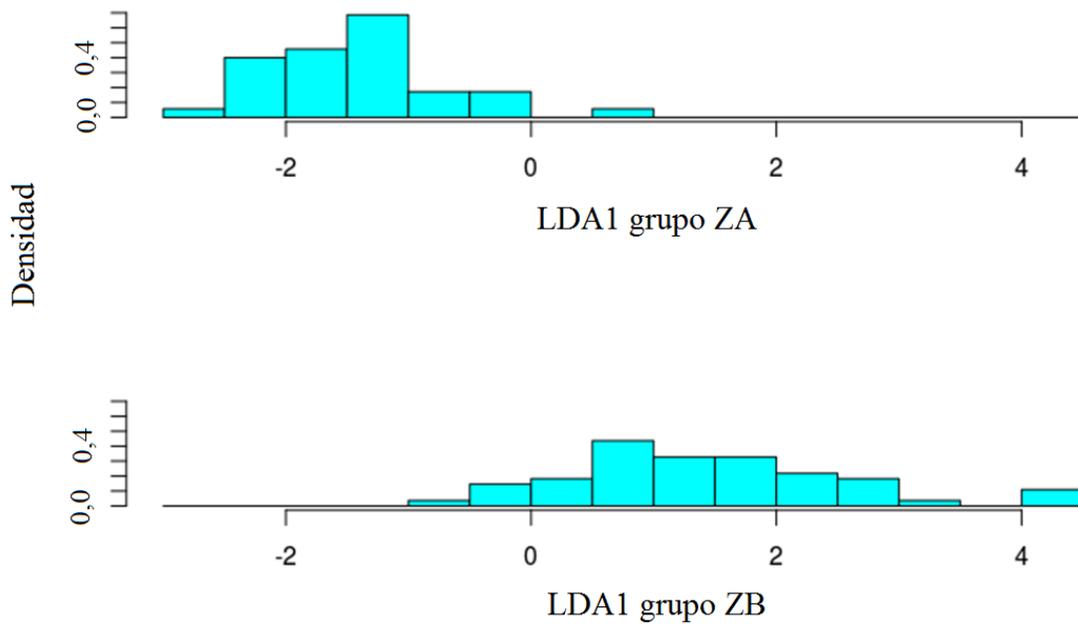
#### **IV. Resultados**

El promedio, la desviación estándar, así como los máximos y mínimos de los caracteres morfológicos del grupo *pipiens* para las diferentes zonas geográficas se muestran en el Cuadro I. Se observa que para la mayoría de las variables los valores más pequeños se presentan en poblaciones de las zonas altas.

**Cuadro I.** Promedios, desviaciones estándar, máximos y mínimos para las variables continuas del grupo *pipiens* separado según zonas geográficas.

Variables	Zonas geográficas						
	ZBPN	ZBPC	ZBZN	VC	ZAPS	ZACVC	ZAT
HA	8,10 ± 1,01 (10,17; 6,03)	8,38 ± 0,30 (8,72; 8,19)	8,61 ± 0,86 (10,32; 7,20)	8,67 ± 0,90 (10,22; 7,58)	6,95 ± 0,40 (7,43; 6,03)	6,90 ± 0,50 (7,93; 6,08)	7,22 ± 0,80 (8,33; 6,14)
AC	2,66 ± 0,30 (3,31; 2,05)	2,71 ± 0,13 (2,86; 2,62)	2,77 ± 0,28 (3,36; 2,39)	2,95 ± 0,33 (3,69; 2,54)	2,26 ± 0,14 (2,49; 2,00)	2,20 ± 0,14 (2,46; 1,99)	2,29 ± 0,30 (2,7; 1,83)
LC	2,07 ± 0,26 (2,95; 1,44)	2,14 ± 0,18 (2,3; 1,95)	2,16 ± 0,26 (2,82; 1,76)	2,20 ± 0,35 (2,85; 1,72)	1,73 ± 0,20 (2,15; 1,51)	1,78 ± 0,22 (2,15; 1,22)	1,69 ± 0,22 (2,23; 1,47)
DT	0,62 ± 0,06 (0,78; 0,50)	0,71 ± 0,03 (0,74; 0,69)	0,65 ± 0,05 (0,77; 0,59)	0,69 ± 0,06 (0,80; 0,63)	0,55 ± 0,06 (0,66; 0,47)	0,56 ± 0,06 (0,66; 0,48)	0,55 ± 0,05 (0,63; 0,45)
DO	1,13 ± 0,15 (1,42; 0,71)	1,15 ± 0,04 (1,18; 1,11)	1,15 ± 0,10 (1,35; 0,97)	1,17 ± 0,12 (1,30; 0,96)	1,07 ± 0,08 (1,22; 0,91)	1,01 ± 0,07 (1,12; 0,85)	0,98 ± 0,10 (1,18; 0,81)
DNN	0,61 ± 0,06 (0,74; 0,47)	0,60 ± 0,04 (0,64; 0,57)	0,67 ± 0,07 (0,80; 0,54)	0,69 ± 0,10 (0,83; 0,49)	0,58 ± 0,04 (0,64; 0,51)	0,59 ± 0,05 (0,67; 0,51)	0,56 ± 0,06 (0,64; 0,49)
DI	0,42 ± 0,08 (0,65; 0,29)	0,38 ± 0,02 (0,4; 0,36)	0,49 ± 0,09 (0,65; 0,31)	0,45 ± 0,08 (0,54; 0,27)	0,42 ± 0,04 (0,49; 0,37)	0,42 ± 0,05 (0,53; 0,34)	0,41 ± 0,05 (0,50; 0,32)
DNO	0,58 ± 0,09 (0,77; 0,42)	0,58 ± 0,04 (0,62; 0,54)	0,63 ± 0,07 (0,83; 0,52)	0,63 ± 0,13 (0,88; 0,47)	0,46 ± 0,03 (0,51; 0,41)	0,42 ± 0,05 (0,51; 0,32)	0,47 ± 0,10 (0,64; 0,32)
DNH	0,58 ± 0,09 (0,88; 0,40)	0,64 ± 0,06 (0,70; 0,58)	0,63 ± 0,08 (0,79; 0,52)	0,65 ± 0,08 (0,81; 0,55)	0,54 ± 0,05 (0,62; 0,45)	0,51 ± 0,05 (0,6; 0,42)	0,54 ± 0,08 (0,66; 0,45)
DC	0,20 ± 0,05 (0,31; 0,14)	0,19 ± 0,05 (0,25; 0,16)	0,22 ± 0,04 (0,35; 0,16)	0,23 ± 0,05 (0,30; 0,15)	0,21 ± 0,04 (0,27; 0,15)	0,16 ± 0,03 (0,22; 0,11)	0,19 ± 0,03 (0,25; 0,16)
DD	0,22 ± 0,05 (0,36; 0,13)	0,29 ± 0,05 (0,33; 0,24)	0,23 ± 0,06 (0,37; 0,12)	0,23 ± 0,05 (0,29; 0,17)	0,20 ± 0,032 (0,26; 0,16)	0,21 ± 0,04 (0,29; 0,15)	0,22 ± 0,04 (0,28; 0,17)
DCC	0,86 ± 0,12 (1,23; 0,71)	0,96 ± 0,06 (1,00; 0,89)	0,93 ± 0,15 (1,25; 0,72)	0,83 ± 0,09 (0,99; 0,73)	0,74 ± 0,04 (0,82; 0,67)	0,78 ± 0,12 (0,98; 0,56)	0,84 ± 0,09 (0,97; 0,74)
LR	1,84 ± 0,20 (2,29; 1,37)	2,04 ± 0,05 (2,08; 1,99)	1,90 ± 0,16 (2,32; 1,67)	1,98 ± 0,18 (2,38; 1,79)	1,52 ± 0,10 (1,76; 1,36)	1,50 ± 0,13 (1,71; 1,22)	1,64 ± 0,15 (1,96; 1,44)
LH	1,60 ± 0,20 (1,95; 1,13)	1,65 ± 0,11 (1,74; 1,53)	1,67 ± 0,16 (2,07; 1,32)	1,87 ± 0,16 (2,00; 1,49)	1,45 ± 0,10 (1,59; 1,32)	1,34 ± 0,10 (1,55; 1,12)	1,31 ± 0,12 (1,47; 1,12)
L3DM	1,91 ± 0,22 (2,32; 1,34)	2,04 ± 0,15 (2,19; 1,90)	2,02 ± 0,13 (2,29; 1,77)	2,13 ± 0,19 (2,54; 1,95)	1,69 ± 0,13 (1,94; 1,53)	1,69 ± 0,16 (2,02; 1,25)	1,73 ± 0,16 (1,96; 1,52)
LT	4,62 ± 0,63 (6,04; 3,44)	4,85 ± 0,29 (5,17; 4,61)	5,08 ± 0,49 (6,18; 4,41)	4,98 ± 0,53 (6,06; 4,55)	3,89 ± 0,23 (4,32; 3,47)	3,83 ± 0,30 (4,44; 3,26)	4,09 ± 0,56 (4,89; 3,30)
LF	3,53 ± 0,52 (4,67; 2,55)	4,11 ± 0,21 (4,28; 3,87)	3,98 ± 0,47 (5,02; 3,12)	4,19 ± 0,54 (5,15; 3,50)	3,04 ± 0,34 (3,57; 2,27)	2,98 ± 0,35 (3,62; 2,22)	3,10 ± 0,33 (3,77; 2,69)
Lcal	2,33 ± 0,35 (3,11; 1,20)	2,45 ± 0,21 (2,69; 2,32)	2,55 ± 0,23 (3,09; 2,20)	2,63 ± 0,38 (3,33; 2,23)	1,99 ± 0,12 (2,27; 1,79)	1,92 ± 0,18 (2,32; 1,65)	2,06 ± 0,25 (2,47; 1,72)
L4DP	4,43 ± 0,48 (5,31; 3,32)	4,46 ± 0,26 (4,76; 4,30)	4,81 ± 0,43 (5,71; 4,13)	4,70 ± 0,42 (5,42; 3,99)	3,90 ± 0,24 (4,39; 3,41)	3,88 ± 0,34 (4,62; 3,05)	4,02 ± 0,47 (4,51; 3,05)

El análisis discriminante clasificó correctamente la muestra de adiestramiento con un porcentaje de acierto del 94,93% clasificando correctamente 34 de 35 individuos de zonas altas y 52 de 55 individuos de zonas bajas. En el caso de la muestra experimental hay un porcentaje de acierto del 86,6%, con una variación de 8,17%, clasificando correctamente 5 de 6 individuos de zonas altas y 13 de 16 individuos de zonas bajas. Los individuos de las zonas altas se encuentran bien agrupados y separados de las zonas bajas, mientras que los individuos de las zonas bajas están más dispersos y algunos de ellos se traslapan con los individuos de zonas altas (**Fig. 6**).



**Fig. 6.** Distribución a lo largo del eje discriminante de las zonas bajas y altas del grupo *pipiens* en Costa Rica

El MANOVA indica que la morfología del grupo *pipiens* difiere significativamente para las siguientes medidas: LC, DO, DOI, NH, DC, LH, LF y L4DP ( $f=1,17$ ,  $gl=5/1$ ,  $p < 0,01$ ) para las siete poblaciones evaluadas (**Fig. 7.**). El análisis de contrastes para el modelo MANOVA realizado muestra que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de zonas bajas de ambas vertientes (ZBZN/ZBPN-ZBPC) (**Cuadro II, Fig. 7.**). Las poblaciones de zonas altas tampoco presentaron diferencias significativas entre sí (ZAT/ZACVC y ZAT/ZAPS) para las variables analizadas, con excepción del diámetro de las coanas que sí presentó diferencia entre las poblaciones de Talamanca donde son de mayor tamaño que en la Cordillera Volcánica Central (**Cuadro III, Fig. 7.**).

**Cuadro II.** Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación de las zonas bajas entre vertientes: zonas bajas de la zona norte contra zonas bajas del Pacífico Norte y zonas bajas del Pacífico Central.

Variables	F	Gl	P
LC	0,0404	1/4	0,8412
DO	1,3348	1/4	0,2506
Dist I	0,0035	1/4	0,9529
Dist N-H	0,0003	1/4	0,9871
DC	0,0948	1/4	0,7588
DD	0,2678	1/4	0,6059
Dist C-C	2,0496	1/4	0,1552
LH	2,1249	1/4	0,1479
LF	0,0929	1/4	0,7611
L4DP	0,2347	1/4	0,6290

**Cuadro III.** Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación entre zona alta de Talamanca (ZAT) y Zona alta de la cordillera volcánica central (ZACVC), además de la comparación entre la zona alta de Talamanca (ZAT) y la zona alta del pacífico sur (ZAPS).

Variables	ZAT/ZACVC			ZAT/ZAPS		
	F	Gl	P	F	Gl	P
LC	0,0164	1/4	0,8983	0,4767	1/4	0,4914
DO	1,2095	1/4	0,8983	0,2256	1/4	0,6358
Dist I	0,0019	1/4	0,9656	0,023	1/4	0,8799
Dist N-H	0,0026	1/4	0,9592	0,4217	1/4	0,5175
DC	0,0033	1/4	0,9542	5,7387	1/4	<b>0,0184</b>
DD	0,3020	1/4	0,5838	0,113	1/4	0,7375
Dist C-C	2,1290	1/4	0,1475	0,115	1/4	0,7352
LH	1,8675	1/4	0,1747	0,6439	1/4	0,4241
LF	0,1208	1/4	0,7288	0,183	1/4	0,6696
L4DP	0,2745	1/4	0,6014	0,1645	1/4	0,6858

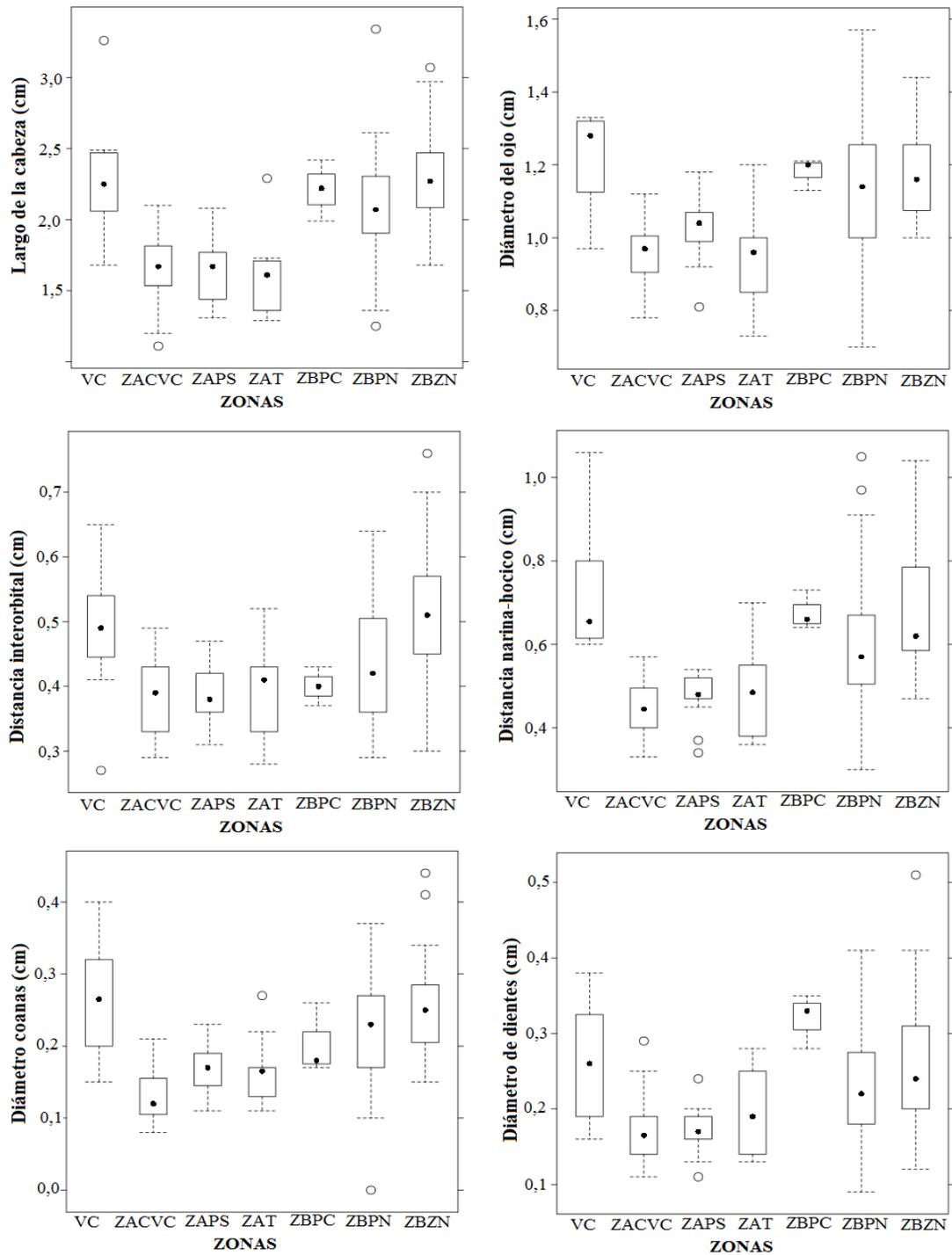
Las pruebas de contraste de la población del Valle Central con las zonas bajas (ZBZN-ZBPN-ZBPC), muestra que no son significativamente diferentes, mientras que con las zonas altas (ZAT-ZAPS-ZACVC) las diferencias sí son significativas para las variables LC, DO, N-H, DOI, DD, DC, C-C, LH, LF y L4DP, siendo de mayor tamaño la población del Valle Central (**Cuadro IV, Fig. 7**). La prueba de contrastes entre todas las poblaciones de zonas bajas más el Valle Central y las poblaciones de zonas altas muestran que hay diferencias significativas entre la distancia interorbital (Dist I), distancia narina-hocico (Dist N-H), diámetro de las coanas (DC), distancia entre coanas (Dist C-C), largo del fémur (LF), largo del segundo dedo de la pata (L4DP) (**Cuadro V, Fig. 7**), siendo todas estas variables siempre con promedio menores en las zonas altas.

**Cuadro IV.** Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación del Valle Central contra zonas bajas (ZBZN, ZBPN, ZBPC) y contra zonas altas (ZAT, ZACVC, ZAPS).

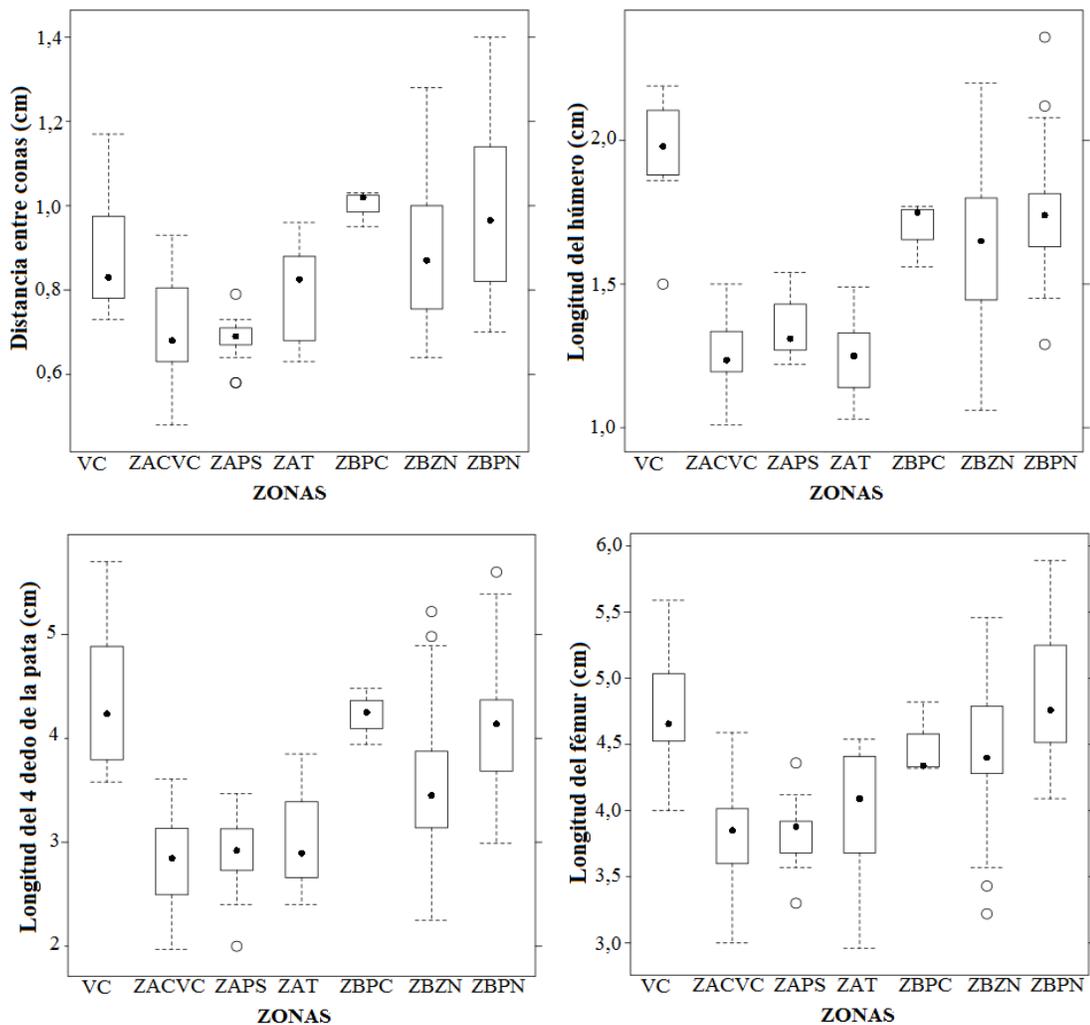
Variables	VC/ZB			VC/ZA		
	F	Gl	P	F	Gl	P
LC	2,1141	1/4	0,1489	87,1853	1/4	< <b>0,0001</b>
DO	1,4802	1/4	0,2264	56,2871	1/4	< <b>0,0001</b>
Dist I	0,6422	1/4	0,4247	24,7012	1/4	< <b>0,0001</b>
Dist N-H	0,7660	1/4	0,3834	66,2938	1/4	< <b>0,0001</b>
DC	0,4662	1/4	0,4962	74,3721	1/4	< <b>0,0001</b>
DD	1,8369	1/4	0,1782	35,2456	1/4	< <b>0,0001</b>
Dist C-C	8,0636	1/4	<b>0,0054</b>	48,1511	1/4	< <b>0,0001</b>
LH	0,0545	1/4	0,8159	144,7337	1/4	< <b>0,0001</b>
LF	0,1302	1/4	0,7189	96,8106	1/4	< <b>0,0001</b>
L4DP	3,6100	1/4	0,0601	87,2766	1/4	< <b>0,0001</b>

**Cuadro V.** Resultado de los contrastes realizados a las variables morfológicas para la comparación entre zonas bajas (ZBZN, ZBPN, ZBPC y VC) y zonas altas (ZAT, ZACVC y ZAPS).

Variables	F	Gl	P
LC	2,6011	1/4	0,1098
DO	1,6994	1/4	0,1952
Dist I	12,042	1/4	<b>0,0007</b>
Dist N-H	4,4082	1/4	<b>0,0381</b>
DC	5,1554	1/4	<b>0,0252</b>
DD	3,5463	1/4	0,0624
Dist C-C	6,2841	1/4	<b>0,0137</b>
LH	2,3876	1/4	0,1253
LF	10,7042	1/4	<b>0,0014</b>
L4DP	13,0316	1/4	<b>0,0005</b>



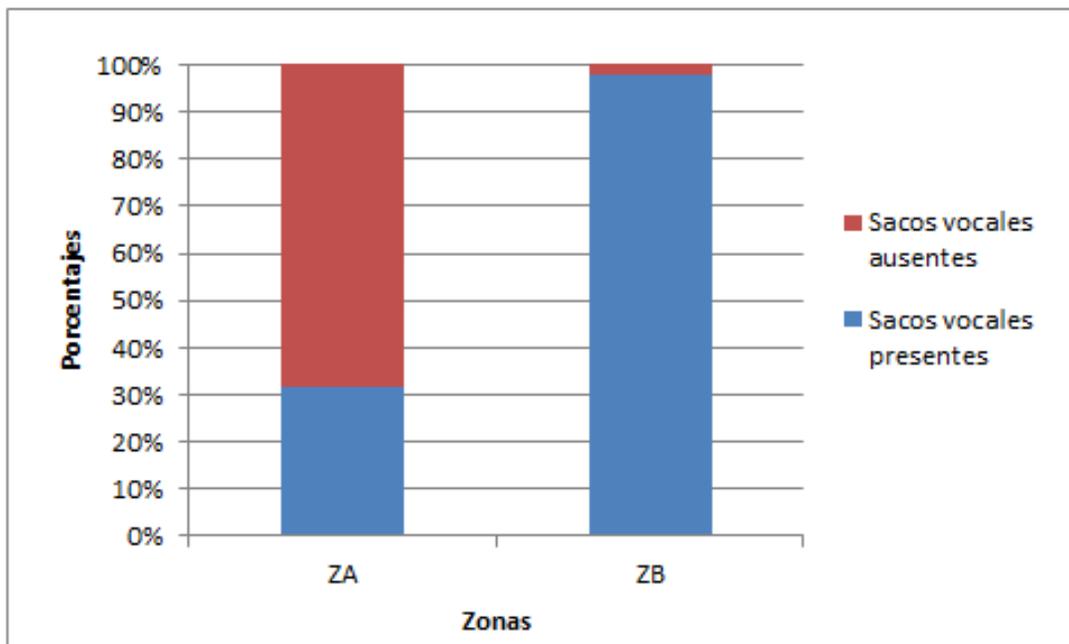
**Fig. 7.** Diagrama de cajas que presenta la mediana (los puntos), el máximo y mínimo (los bigotes) y los cuartiles (cajas verdes) para cada variable transformada según el método de Leonart *et al.* 2000, según la zona de colecta.



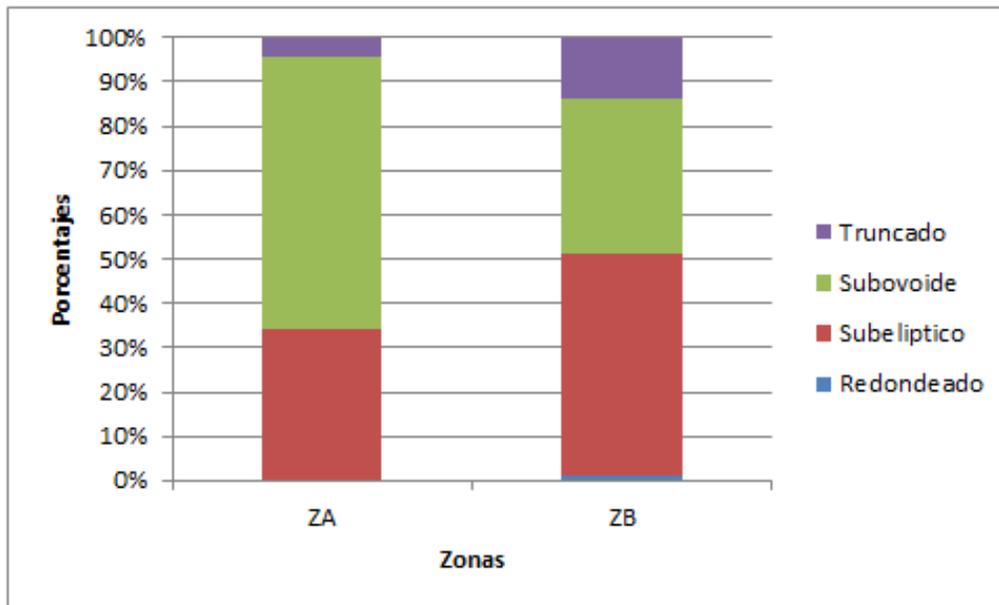
**Fig. 7.** Continuación del diagrama de cajas que presenta la mediana (los puntos), el máximo y mínimo (los bigotes) y los cuartiles (cajas verdes) para cada variable transformada según el método de Lleonart *et al.* 2000, según la zona de colecta.

El análisis de las variables cualitativas indica que para el color dorsal no hay diferencia entre la proporción de individuos verdes, cafés y grises entre zonas altas y zonas bajas ( $X^2=4,5870$ ;  $gl= 2$ ;  $p=0,1009$ ). Tampoco hay diferencias para la proporción de la coloración del vientre (beige y beige con puntos negros) ( $X^2= 0,0220$ ,  $gl=1$ ,  $p=0,8833$ ), la proporción de la coloración de la parte gular ( $X^2= 1,720$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,4236$ ), la proporción de

las líneas dorsales (continuas, discontinuas y una continua y una discontinua) ( $X^2=2,4190$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,2983$ ) y la proporción del perfil del hocico (acuminado, obtuso, redondeado y vertical) ( $X^2= 3,6380$ ;  $gl=3$ ;  $p=0,3032$ ). Sin embargo hay dos caracteres cualitativos que sí presentan una diferencia significativa entre zonas bajas y zonas altas. La primera son los sacos vocales, para los cuales la proporción de machos con sacos vocales es mayor en las zonas bajas y menor en las zonas altas ( $X^2=38,0130$ ;  $gl=1$ ;  $p= <0,0001$ ) (**Fig. 8**). En el caso del contorno del hocico la proporción de individuos con un contorno subovoide presenta una mayor proporción en los individuos de zonas altas, mientras que en las zonas bajas predomina el contorno subelíptico ( $X^2=10,2200$ ;  $gl=3$ ;  $p=0,0168$ ) (**Fig. 9**).



**Fig 8.** Porcentaje de la presencia y ausencia de los sacos vocales en los machos del grupo *pipiens* para Costa Rica según zonas altas y zonas bajas.



**Fig 9.** Porcentajes de las distintas formas del contorno del hocico de los individuos del grupo *pipiens* para Costa Rica según zona baja o zona alta.

## V. Discusión

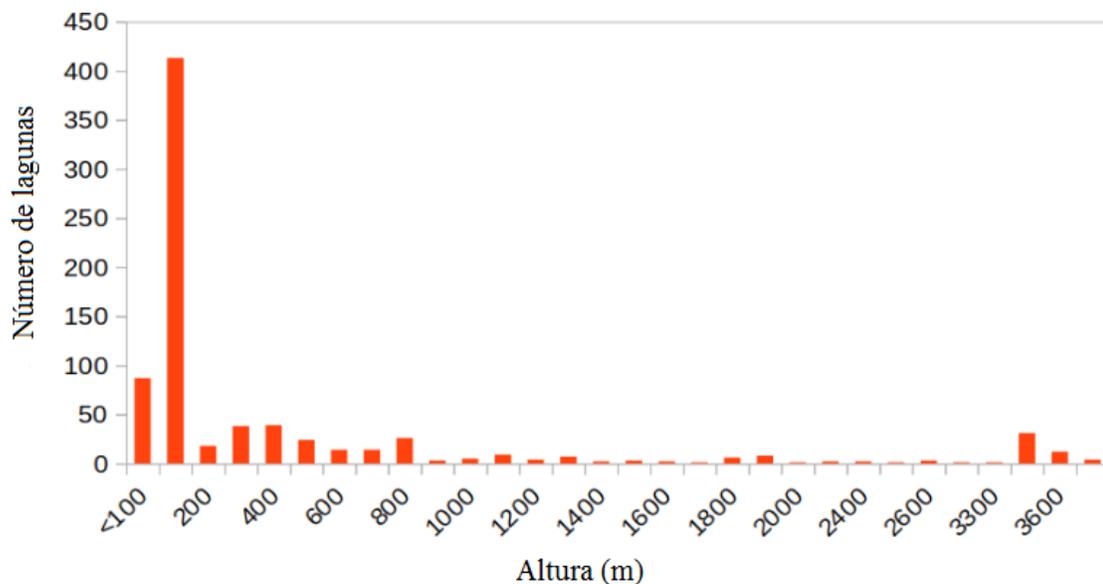
Del análisis morfológico se estableció que las características que se usan para separar *L. forreri* de *L. taylori* como la continuidad o discontinuidad de las líneas dorsales no son útiles para separarlas. Los patrones de esta característica no se ajustan a la distribución encontrada para estas especies. Siendo la separación de las especies la altura, *L. forreri* es la que se encuentra en zonas bajas y *L. taylori* en zonas altas. Lo que indica que la distribución actual y las poblaciones propuestas por Savage (2002) no coinciden con los resultados obtenidos.

A pesar de que Costa Rica es un país muy montañoso, estas montañas se separan después de los 1000 m, formando picos aislados con varios pasos bajos entre ellos (Coen 1991) que pueden facilitar el paso de los diferentes organismos entre vertientes. Muchas especies son capaces de transitar por estos pasos de menor altitud por lo que su distribución no queda restringida a una sola vertiente. Esto es más pronunciado en la región norte del país, en donde la Zona Norte y el Pacífico Norte están separados por la cordillera de Guanacaste que posee varios pasos entre los volcanes con menos de 500 m de altitud (Atlas de Costa Rica 2014).

La población de *L. forreri* del Valle Central es una excepción al grupo de ranas de altura ya que esta población es morfológicamente similar a las poblaciones de *L. forreri* de zonas bajas. Según la distribución de la herpetofauna del país (Savage 2002) el Valle Central pertenece a la misma provincia herpetológica presente en el Pacífico Norte. Estas dos zonas presentan una época lluviosa similar en la cantidad de meses a la época seca, lo que las diferencias de otras regiones del país en donde la cantidad de meses lluviosos es mayor en cantidad a los meses secos (Coen 1991). Sin embargo, el estudio de estas poblaciones en el Valle Central se ha vuelto complejo ya que estos individuos se reproducen en lagunas, las cuales en el Valle Central han desaparecido en gran medida debido a la expansión de la ciudad y en muchos casos las pocas que quedan no se encuentran bien protegidas.

A parte de la presencia de algunas poblaciones en zonas de altitud intermedia, los datos mostraron que en general no hay poblaciones del grupo *pipiens* en el premontano (entre 800 y 1400m). Esto es también cierto para todas las especies del género *Lithobates*

del país, con excepción de *L. warzewitschii*. Esto se puede deber a que la presencia de lagunas para reproducción de anuros está sesgada en las zonas bajas de Costa Rica (**Fig. 10**). Drásticamente la cantidad de lagunas descende a partir de los 800 m (**Fig. 10**). Esta reducción se debe a que en las laderas de las montañas las lagunas son inestables y pueden derrumbarse haciendo que su número se reduzca (Sasa *et al.* 2010).



**Fig. 10.** Cantidad de lagunas según la altitud para Costa Rica, calculado con base en el mapa de lagunas tomado del Atlas digital de Costa Rica con una escala 1/50 000.

Otro factor que puede estar incidiendo en la falta de poblaciones del grupo *pipiens* puede estar relacionado con la calidad de las lagunas presentes. En muchas áreas las lagunas son eliminadas intencionalmente para ser usadas para la agricultura y en otras ocasiones para la cría y pesca de truchas (Sasa *et al.* 2010), por lo que podría explicar la ausencia de poblaciones en zonas intermedias. Tampoco son todas las lagunas utilizadas

para reproducirse, solo las que tienen un gradiente en la profundidad en la orilla, donde por lo general hay mucha vegetación, la cual necesitan para colocar los huevos. Por lo que en las lagunas visitadas (San Vito de Coto Brus), las que no tenían este gradiente de profundidad en la orilla no presentaban individuos de ninguna de las dos especies.

La relación entre el patrón de distribución de los caracteres morfológicos y las hipótesis taxonómicas vigentes para el grupo *pipiens* en Costa Rica es compleja. En apoyo a la hipótesis de que existen dos especies del grupo *pipiens* en el país se puede citar el hecho de que morfológicamente se encontraron dos grupos, uno para zonas bajas y otro para zonas altas, además de que es posible clasificar cualquier individuo de este grupo de ranas en el país con más de un 86,6% de certeza como pertenecientes al grupo de zonas bajas o de zonas altas. Importante es resaltar que a pesar de que el tamaño de los individuos es lo que mejor define cada agrupación, la tendencia del tamaño de estas ranas es opuesta a las características climáticas en donde viven. Liao y Lu (2011 y 2012) indican que individuos ectotérmicos como los anfibios y reptiles tienden a ser más grandes en climas fríos ya que reduce la pérdida de calor. Sin embargo en el grupo *pipiens* en Costa Rica las poblaciones de individuos pequeños se presentan en las zonas altas en donde la temperatura promedio se reduce entre 6 a 12 grados con respecto a la temperatura promedio en zonas bajas que es cerca de 30° C (Coen, 1991). Por otra parte la presencia de algunas pocas poblaciones a alturas intermedias claramente asignables a alguno de los grupos de alturas extremas indica que no hay poblaciones con características intermedias, por lo que al parecer no hay zonas de hibridización.

También es posible que el patrón de variación morfológica observado respalde la hipótesis de que el grupo *pipiens* contiene numerosas especies crípticas. Se consideran especies crípticas aquellas que no se pueden diferenciar morfológicamente y que debido a esto en algún momento fueron confundidas con otra especie (Guevara y Sainoz 2012). Las especies crípticas están en una parte de su proceso evolutivo donde aunque acumulan diferencias genéticas, morfológicamente no han necesitado cambiar ya que ecológicamente se encuentran bien adaptadas al medio en el que se desenvuelven (Sáez 2009). Aunque el tamaño claramente separa ambos grupos de ranas los otros caracteres cualitativos no presentan patrones definidos entre las distintas poblaciones. Es precisamente esta convergencia en los patrones de coloración lo que ha complicado la identificación de las especies en el pasado. Según Hillis y Wilcox (2005) la especie asignada a *L. taylori* de la vertiente Caribe de Nicaragua es diferente filogenéticamente a la especie de Costa Rica en la región montañosa del Caribe costarricense y es diferente a la población de la zona baja de la vertiente del Pacífico. Esto indica que en el Caribe al menos tenemos dos especies con una muestra de un individuo para cada uno que son diferenciables molecularmente con respecto a las poblaciones del Pacífico. Sin embargo la resolución del análisis de Hillis y Wilcox (2005) es muy débil dado que usaron muy poca muestra de nuestro país. Con respecto a las zonas altas, es claro que las posibles especies propuestas por Savage (2002) no son claramente discernibles morfológicamente, si es notorio que en Costa Rica hay una diversificación de muchas especies relacionadas entre las cuatro cadenas montañosas. Ejemplo de ello son las salamandras del grupo *subpalmata* que se separan entre la cordillera Volcánica Central y la de Talamanca (García-París *et al.* 2000), pero además se

separan entre los distintos picos de la cordillera de Talamanca (Boza-Oviedo *et al.* 2012). También en los sapos de hojarasca del género *Crepidophryne* se ha encontrado una especiación similar (Vaughan y Mendelson 2007). Por lo tanto sólo con análisis moleculares se podría dilucidar si ocurre o no la presencia de especies crípticas para el grupo *pipiens* (Crawford *et al.* 2012). La resolución de estos posibles problemas taxonómicos se vuelve más importante, ya que las medidas de conservación que se toman para algunas de las poblaciones pueden no ser suficientes para conservar otras poblaciones que podrían pertenecer a especies diferentes (Ángulo 2002).

A nivel internacional el problema taxonómico del grupo *pipiens* sigue siendo incierto. A partir del análisis del árbol presentado por Hillis y Wilcox (2005) se encuentra que la asignación de *L. forreri* para las poblaciones de zonas bajas del Pacífico costarricense no se sustenta. La población de *L. forreri* en México es diferente molecularmente a la población de Esparza en el Pacífico central de Costa Rica (**Fig 1**). Lo mismo parece ocurrir con *L. taylori* entre Costa Rica y Nicaragua. De estos resultados se puede concluir que posiblemente hayan muchas más especies no descritas en el grupo *pipiens* para Mesoamérica. Un estudio amplio a nivel mesoamericano y con mayor cantidad de muestras por localidad debería realizarse para dilucidar este problema.

## **VI. Conclusiones**

Se encontró soporte morfológico que apoya la presencia de al menos dos especies del grupo *pipiens* en Costa Rica. Sin embargo se rechaza la separación de estas dos

especies por vertiente. La distribución geográfica sería una especie en las zonas bajas de ambas vertientes, con una población aislada en el Valle Central. La otra especie estaría distribuida en el piso premontano alto y montano de las cordilleras Central y de Talamanca, con algunas poblaciones en zonas bajas de la cuenca del Reventazón.

Las características morfológicas cualitativas no sirven para diferenciar ninguna de las especies del grupo *pipiens* en el país. Se requiere utilizar variables cuantitativas para separar ambos grupos.

Siguiendo los resultados obtenidos y el árbol de Hillis y Wilcox (2005) se puede sugerir que en Costa Rica no se encuentra presente *L. forreri*, por lo que la especie de *Lithobates* presente en zonas bajas sería otra, posiblemente aún no descrita. Para el caso de *L. taylori* se determinó que se encuentra en Costa Rica en las zonas altas, sin embargo las poblaciones nicaragüenses posiblemente sean una especie diferente, posiblemente no descrita aún también.

## VI. Referencias

- Acosta-Galvis, A. R. 1999. Distribución, variación y estatus taxonómico de las poblaciones del complejo *Rana palmipes* (Amphibia: Anura: Ranidae) en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23: 215-224.
- Angulo, A. 2002. Anfibios y paradojas: perspectivas sobre la diversidad y las poblaciones de anfibios. *Ecología Aplicada* 1: 105-109.
- Arias, E., Chaves, G., Crawford, A. J. y Parra-Olea, G. 2016. A new species of the *Craugastor podiciferus* species group (Anura: Craugastoridae) from the premontane forest of southwestern Costa Rica. *Zootaxa*, 4132: 347-363.
- Ortiz-Malavasi, E. 2014. Atlas digital de Costa Rica. Recuperado de: <http://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/6749?show=full>
- Badyaev, A. V. 1997. Avian life history variation along altitudinal gradients: an example with cardueline finches. *Oecología* 111: 365-374. Doi: 10.1007/s004420050247
- Baraquet, M., Grenat, P. R., Salas, N. E. y Martino A. L. 2012. Variación morfométrica y geográfica entre poblaciones de *Hypsiboas cordobae* (Anura: Hylidae) en Argentina. *Cuadernos de Investigación UNED* 4: 147-155.
- Bolaños, F., Chaves, G., Savage, J. y Köhler, G. 2008. *Lithobates taylori*. The IUCN Red List of Treated Species. Versión 2014.2. Recuperado de: <http://www.iucnredlist.org/details/58732/0>
- Boza-Oviedo, E., S. M. Rovito, G. Chaves, A. García-Rodríguez, L. G. Artavia, F. Bolaños and D. B. Wake. 2012. Salamanders from the eastern Cordillera de Talamanca, Costa Rica, with descriptions of five new species (Plethodontidae: *Bolitoglossa*, *Nototriton*, and *Oedipina*) and natural history notes from recent expeditions. *Zootaxa* 3309: 36-61.
- Bussing, W. 1998. Peces de las aguas continentales de Costa Rica. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 46(2): 1 – 468.
- Boulenger, G. A. 1883. Descriptions of new species of lizards and frogs collected by Herr A. Forrer in Mexico. *Annals and magazine of natural history* 11 (65): 342-344.

- Camero-R, E. 2003. Caracterización de la fauna de carábidos (Coleoptera: Carabidae) en un perfil altitudinal de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 27: 491-516.
- Castillo-Muñoz, R. 1991. Geología de Costa Rica. En Janzen, DH (ed.), *Historia Natural de Costa Rica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Pp: 47-61.
- Cortez-Fernández, C. 2006. Variación altitudinal de la riqueza y abundancia relativa de los anuros del Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Cotapata. *Ecología en Bolivia* 41(1): 46-64.
- Coen, E. 1991. Clima. En Janzen, DH (ed.), *Historia natural de Costa Rica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Pp: 35-46.
- Cope, E. D. 1889. *The Batrachia of North America* (No. 34). US Government Printing Office.
- Crawford, A. J., Toral E. y Bolaños, F. 2003. Geographic distribution. *Leptodactylus poecilochilus*. *Herpetological Review* 34: 258-259.
- Crawford A. J, Bermingham, E. y Polanía. C. 2007. The role of tropical dry forest as a long-term barrier to dispersal: A comparative phylogeographic analysis of dry forest tolerant and intolerant frogs. *Molecular Ecology* 16: 4789-4807. Doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03524.x
- Crawford, J.A., Cruz, E. Griffith, H. Ross, R. Ibañez, K Lips, A. C. Driskell, E. Bermingham y Crump. P. 2012. DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Molecular Ecology Resources* 13 (6): 1005-1018. Doi: 10.1111/1755-0998.12054
- de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886. Doi: 10.1080/106351507017010883
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. En Howardy D. J. y Berlocher S. H (ed.). *Oxford University Press, Nueva York. Endless forms: Species and speciation*. Pp 57-75.

- Dickerson, M. C. 1908. The frog book: North American toads and frogs with a study of the habits and life histories of those of the northeastern states (Vol. 12). Doubleday, Page & Company, Nueva York. Pp 253.
- Duellman, W. E. 1970. The Hylid Frogs of Middle America. Lawrence, KS: Museum of Natural History, The University of Kansas.
- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B., De Sá, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Molder, P., Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green D. M. y Wheeler, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of American Museum of Natural History* 297: 1-370.
- García-París, M., Good, D. A., Parra-Olea, G. y Wake, D. B. 2000. Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4): 1640–1647.
- Quantay, E. A., Acosta, N. R. y Núñez, H. A. 2013. Phenotypic plasticity in larval development and size at metamorphosis in *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) from Salta, Argentina. *Phyllomedusa* 12: 117-124.
- Guerrero-Campo, J. 1995. Variación altitudinal y dimorfismo sexual en la coloración y biométrica del Tritón Pirenaico (*Euproctus asper*, Amphibia- Salamandridae). *Lucas Mallada* 7: 213-225.
- Guevara, L.M., y A. Sainoz. 2012. Especies crípticas: diferentes especies con una misma forma. *Ciencia y Desarrollo* 38 (258): 6-13.
- Hillis, D. M., y De Sá, R. 1988. Phylogeny and taxonomy of the *Rana palmipes* group (Salientia: Ranidae). *Herpetological Monographs* 2: 1-26.
- Hillis, D. M. y Wilcox, T. P. 2005. Phylogeny of the New World true frogs (*Rana*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 299–314.
- Hillis, D. M. 1988. Systematics of the *Rana pipiens* complex: puzzle and paradigm. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 39-63.

- Instituto Meteorológico de Costa Rica. Solano, J. y Villalobos, R. Regiones y subregiones climáticas de Costa Rica. Recuperado de :  
<https://www.imn.ac.cr/documents/10179/20909/Regionalizaci%C3%B3n+clim%C3%A1tica+de+Costa+Rica>
- Kauffeld, C. 1937. The Status of the Leopard Frogs, *Rana brachycephala* and *Rana pipiens*. *Herpetologica* 1(3): 84-87. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3890569>
- Kawecki, T. J. y Ebert, D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7: 1225-1241. Doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x
- Liao, W. y Lu, X. 2011. Variation in body size, age and growth in the Omei treefrog (*Rhacophorus omeimontis*) along an altitudinal gradient in western China. *Ethology Ecology & Evolution* 23: 248–261.
- Liao, W. y Lu, X. 2012. Adult body size = f (initial size + growth rate x age): explaining the proximate cause of Bergman's cline in a toad along altitudinal gradients. *Evolutionary Ecology* 26: 579–590. Doi: 10.1007/s10682-011-9501-y
- Leonart, J., Salat, J. y G. J. Torres. 2000. Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal theoretical biology* 205: 85-93.
- Marquis, O. y Miaud, C. 2008. Variation in UV sensitivity among common frog *Rana temporaria* populations along an altitudinal gradient. *Zoology* 111: 309-317.
- Moore, J. A. 1975. *Rana pipiens*: The changing Paradigm. *American Zoology* 15: 837-849.
- Platz, J. E. 1976. Biochemical and morphological variation of leopard frogs in Arizona. *Copeia* 4: 660-672.
- Pigliucci, M. 2003. Species as family resemblance concepts: the (dis-)solution of the species problem? *BioEssays* 25:596–602.
- Sáez, A. G. 2009. Genes y especies. *Revista Ecosistemas* 18(1): 3-9.

- Santos-Barrera, G., Chaves, G., Savage, J., Wilson, L.D. y Bolaños, F. 2008. *Lithobates forreri*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. Recuperado de: <http://www.iucnredlist.org/details/58599/0>
- Sasa, M., Chaves, G. y L.W. Porras. 2010. Costa Rica's herpetofauna: conservation status and future perspectives. *In*: Wilson, L.D., Townsend, J.H. y J. D. Johnson, (Eds), Conservation of Mesoamerican Amphibians and Reptiles. Eagle Mountain Publishing, LC, Eagle Mountain, Utah.
- Savage, J. M. 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between Two Continents, between Two Seas. Chicago:University of Chicago Press.
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. 2004. Operational criteria for delimiting species. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 35: 199-277.
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. Trends in Ecology and Evolution 18: 462- 470.
- Smith, H. M. 1959. Herpetozoa from Guatemala, I. Herpetologica 15: 210-216.
- Taylor, E. H. 1952. A review of the frogs and toads of Costa Rica. University of Kansas Science Bulletin 35: 577-941.
- Uribe, F., Hernández, E., Nebot, J., Orozco, A., Bros, V. y Cadavall, J. 2007. Variación del tamaño de la concha en tres especies de caracoles terrestres (Chodrinidae, Hygromiidae) respecto al gradiente altitudinal en los pirineos. Iberus 25: 1-9.
- Vaughan A. y J. R. Mendelson III. 2007. Taxonomy and ecology of the Central American Toads of the Genus *Crepidophryne* (Anura: Bufonidae) Copeia 2007 (2): 304-314.
- Yuan, Z. Y., Zhou, W. W., Chen, X., Poyarkov, N. A., Chen, H. M., Jang-Liaw, N. H., y S. L. Kuzmin. 2016. Spatiotemporal diversification of the true frogs (Genus *Rana*): a historical framework for a widely studied group of model organisms. Systematic biology 65(5): 824-842.

