



Universidad de Caldas

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

**HISTORIA EVOLUTIVA Y ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *RHAEBO*
COLOMAI (AMPHIBIA: BUFONIDAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DE
COLOMBIA Y ECUADOR**

MARÍA ALEJANDRA ROJAS RIVERA
PARA OBTENER EL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Manizales, Caldas, Colombia (septiembre, 2022)



Universidad de Caldas

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

**HISTORIA EVOLUTIVA Y ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *RHAEBO*
COLOMAI (AMPHIBIA: BUFONIDAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DE
COLOMBIA Y ECUADOR**

MARÍA ALEJANDRA ROJAS RIVERA
PARA OBTENER EL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR: GHENNIE TATIANA RODRÍGUEZ REY, Ph. D.
CODIRECTOR: PAUL DAVID ALFONSO GUTIÉRREZ CÁRDENAS, Ph. D.

Manizales, Caldas, Colombia (septiembre, 2022)

Universidad de Caldas



55
56
57
58
59
60
61
62

Aprobación final del documento de tesis de grado:

“Historia evolutiva y estructura genética poblacional de *Rhaebo colomai* (Amphibia: Bufonidae), una especie amenazada de Colombia y Ecuador”

	Nombre	Firma
Director (es)	Ghennie Tatiana Rodríguez Rey	
	Paul David Alfonso Gutiérrez Cárdenas	

63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73

Jurados

AGRADECIMIENTOS

74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103

Agradezco enormemente a la profesora Ghennie Tatiana Rodríguez Rey por su infinito apoyo, por su dedicación y su paciencia en cada momento. Su acompañamiento fue crucial para lograr cumplir la meta que nos establecimos desde el inicio. Agradezco a la profesora Lucimar Gomes Dias por brindarme su respaldo y abrir las puertas del Laboratorio de Colecciones Biológicas donde realicé el procesamiento molecular de las muestras.

Agradezco a la Universidad de Caldas y al programa de Maestría en Ciencias Biológicas por fortalecer mis conocimientos. A IdeaWild (beca ALFOCOLO0318), The Rufford Foundation (becas 13572-1 y 16960-2), The Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund (código 14259595), Asociación Colombiana de Herpetología (Beca Botas al Campo, BC2019-08) y Fundación Alejandro Ángel Escobar (beca Colombia Biodiversa), por la financiación parcial de este trabajo.

Por último, quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi familia, son esa energía que me impulsa a terminar todos los procesos con éxito. Agradezco a mi esposo porque con cada charla académica contribuyó constantemente para mejorar y consolidar este trabajo. Finalmente, agradezco a mi hijo por la paciencia y por comprender mi ausencia durante este período, su sonrisa y su amor siempre fueron una motivación para mí.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

104
105
106 Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en
107 esta tesis fue efectuado por María Alejandra Rojas Rivera como estudiante de la Maestría en
108 Ciencias Biológicas entre febrero de 2019 y septiembre de 2022, bajo la supervisión y orientación
109 de Ghennie Tatiana Rodríguez Rey y Paul David Alfonso Gutiérrez Cárdenas.

110
111 Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros
112 grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

113

Candidato(s): María Alejandra Rojas Rivera

Director(es) de tesis: Ghennie Tatiana Rodríguez Rey
Paul David Gutiérrez Cárdenas

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132
133

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	9
BIBLIOGRAFÍA	13
CAPÍTULO 1. Historia evolutiva y estructura genética poblacional de <i>Rhaebo colomai</i> (Amphibia: Bufonidae), una especie amenazada de Colombia y Ecuador	16
RESUMEN	17
1. INTRODUCCIÓN	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Área de estudio	21
2.2. Recolección, extracción y amplificación de muestras	21
2.3. Historia evolutiva	24
Tiempos de divergencia y reconstrucción de áreas ancestrales	24
Historia demográfica	27
Modelamiento de nicho	28
2.4. Estructuración genética y variabilidad poblacional de <i>Rhaebo colomai</i> en Colombia	30
3. RESULTADOS	33
3.1. Historia evolutiva	33
Tiempos de divergencia y reconstrucción de áreas ancestrales	33
Historia demográfica	33
Modelamiento de nicho	35
3.2. Estructuración genética y variabilidad poblacional de <i>Rhaebo colomai</i> en Colombia	38
4. DISCUSIÓN	42
4.1. Historia evolutiva	42
4.2. Estructuración genética y variabilidad poblacional de <i>Rhaebo colomai</i> en Colombia	44
4.3. Implicaciones para la conservación	49
5. BIBLIOGRAFÍA	50
6. MATERIAL SUPLEMENTARIO	68
6.1. Tabla S1. Secuencias de especies y números de acceso en el GenBank	68

134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144

- Figura 1.** *Rhaebo colomai* (A) y su distribución geográfica en Colombia y Ecuador (B). Los registros históricos en Ecuador son de 1984 reportados por Hogmooed (1985, 1989). Los registros recientes son posteriores a 2005 (Ron *et al.*, 2015; Reyes-Puig *et al.*, 2019). Coordenadas geográficas en Tabla 3 11
- Figura 2.** Localización de los sitios de muestreo (A) en la Reserva Natural Río Ñambí (B) en el departamento de Nariño (Colombia) (C) 22
- Figura 3.** Tiempos de divergencia y reconstrucción de la distribución geográfica ancestral del género *Rhaebo*. La probabilidad posterior bayesiana y los valores de Máxima Verosimilitud filogenética están separados por una barra lateral respectivamente. El * representa valores de probabilidad posterior > 0.99. Los números en negrilla en cada nodo indican los tiempos de divergencia. Los círculos en los nodos muestran las reconstrucciones ancestrales más probables inferidas por el análisis S-DIVA (el área en cada torta es proporcional a la probabilidad máxima). Los cuadrados en las puntas de cada rama indican la distribución geográfica actual de las especies existentes muestreadas en la filogenia. Los colores correspondientes a las diferentes distribuciones geográficas se muestran a la izquierda. Las otras especies empleadas en los análisis filogenéticos y de tiempos de divergencia fueron removidas *a posteriori* para mayor claridad 34
- Figura 4.** *Bayesian Skyline Plot* (BSP) derivado de las secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) para *Rhaebo colomai*. La estimación de la media del tamaño poblacional se muestra como una línea sólida gruesa y los límites de confianza del 95 % están representados como líneas azules. La línea punteada corresponde al tiempo de coalescencia de las secuencias y, así mismo, al inicio aproximado del tiempo de expansión poblacional de la especie (~ 12 980 años). En barras grises se indica el período de duración del LGM en el Ecuador y el LGM global. 35
- Figura 5.** Variables climáticas de mayor importancia para el desempeño del modelo (Ver tabla 4 para abreviaturas) 36
- Figura 6.** (A) Distribución potencial para *Rhaebo colomai*. Reconstrucciones paleoclimáticas durante el (B) LGM (21 000 años) y (C) Plioceno (3.3 M.a.) 37
- Figura 7.** MESS para *Rhaebo colomai* durante (A) LGM (21 000 años) y (B) Plioceno (3.3 M.a.). Las áreas azules (valores MESS positivos) corresponden a áreas proyectadas con condiciones climáticas similares al modelamiento del presente, mientras que las áreas de color rojo (valores MESS negativos) indican el grado de diferencia en el área de proyección con respecto a las condiciones climáticas del modelamiento del presente 38
- Figura 8.** Red de haplotipos (Hap; círculos) para el gen COI de *Rhaebo colomai* en la Reserva Natural Río Ñambí (Colombia). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de estos. Cada color representa el sitio de muestreo evaluado y las líneas transversales representan los eventos mutacionales 40
- Figura 9.** Análisis bayesiano implementado en BAPS mostrando heterogeneidad genética entre los sitios de muestreo para *Rhaebo colomai*. Cada color representa una población genéticamente distinguible. El color gris claro son individuos que tiene el haplotipo Hap3, el color negro aquellos con el haplotipo Hap2 y el color gris oscuro son individuos con los haplotipos Hap1 y Hap4

Figura 10. Prueba de aislamiento por distancia con test de Mantel. Distancia genética de Φ_{ST} vs las distancias geográficas de los sitios de muestreo (A). Distancia genética de F_{ST} vs las distancias geográficas de los sitios de muestreo (B)

148
149

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. (A) Características (coordenadas geográficas, altitud, cantidad (N) de individuos colectados y número de secuencias obtenidas (COI) del gen Citocromo Oxidasa I de los cuatro sitios de muestreo de <i>Rhaebo colomai</i> en la Reserva Natural Río Ñambí, Barbacoas (Nariño, Colombia); (B) distancia (m) entre pares de sitios de muestreo. Quebrada (Q), Bosque (Bq)	22
Tabla 2. Regiones biogeográficas utilizadas para indicar la distribución de las especies del género <i>Rhaebo</i> en América Central y América del Sur	27
Tabla 3. Localidades registradas para <i>Rhaebo colomai</i> en Colombia (COL) y Ecuador (ECU)	30
Tabla 4. Lista de variables bioclimáticas utilizadas en los modelos de nicho de <i>Rhaebo colomai</i>	30
Tabla 5. Evaluación de los cuatro métodos implementados en el paquete <i>sdm</i> . AUC: área bajo la curva, TSS: True skill statistic. BRT: Boosted regression tree, GLM: Generalized linear models, Maxent: Maximum entropy, RF: Random Forest	36
Tabla 6. Variabilidad genética del gen COI de <i>Rhaebo colomai</i> en la Reserva Natural Río Ñambí. N: número de individuos; S: número de sitios polimórficos; N _H : número de haplotipos; H: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica. SD: desviación estándar	39
Tabla 7. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para <i>Rhaebo colomai</i> . %: porcentaje de variación; P: P-valor. Los sitios con igual color representan el mismo agrupamiento. Sigla de los sitios como en la Tabla 1	37
Tabla 8. Valores de Φ_{ST} y F_{ST} par a par del gen COI para <i>Rhaebo colomai</i> . Arriba de la diagonal los valores Φ_{ST} y debajo de la diagonal los valores F_{ST} . Entre paréntesis se muestran los P-valores. El * indica los P-valores estadísticamente significativos después de la corrección FDR empleando un P-valor de 0.05. Sigla de los sitios como en la Tabla 1	38

150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160

INTRODUCCIÓN GENERAL

161
162
163 Los datos genéticos han representado en años recientes un papel importante en la biología para la
164 conservación (Allendorf & Luikart, 2007), ya que permiten evaluar si una especie puede estar en
165 peligro de extinción (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009), brindan
166 información valiosa sobre la estructura demográfica y la historia de una población (Escudero *et*
167 *al.*, 2003) y permiten identificar unidades evolutivas independientes a través del rango geográfico
168 de una especie mediante la evaluación de la distribución de la variación genética (Allendorf &
169 Luikart, 2007). Además, conocer la variabilidad genética puede ser útil para la conservación de
170 las poblaciones, ya que este parámetro influye en la persistencia de una especie en el tiempo y el
171 espacio. Por lo tanto, cuantificar y preservar dicha variabilidad es la preocupación principal de los
172 estudios de genética para la conservación (Hedrick, 2001).

173
174 La filogeografía, con relación a lo anterior, es una herramienta importante que permite comprender
175 la distribución de la variación genética intra e interpoblacional, y así ayudar a determinar las
176 prioridades de conservación y las estrategias de gestión de las poblaciones (Beebee, 2005).
177 Además, provee señales sobre cuáles factores geológicos, climáticos y ecológicos influyeron en el
178 pasado y determinaron la actual distribución de los organismos (Avise *et al.*, 1987). Además,
179 describe eventos históricos, como, por ejemplo, la expansión del área de distribución de las
180 poblaciones (Hardy *et al.*, 2002) y los procesos que afectan su estructura genética (Avise *et al.*,
181 1987; Avise, 2009).

182
183 Los modelos de nicho se han integrado a los estudios filogeográficos para mejorar la comprensión
184 de los procesos que estructuran la variación genética a través del paisaje (Arbogast & Kenagy,
185 2001; Alvarado-Serrano & Knowles, 2013; Neal *et al.*, 2018; Pahad *et al.*, 2020). Estos estudios
186 proporcionan una combinación interesante de escalas temporales y geográficas para suministrar
187 un marco flexible y evaluar los patrones de variación genética bajo diversas condiciones históricas
188 que pudieron contribuir a los patrones contemporáneos de la diversidad de las especies (Richards
189 *et al.*, 2007).

190

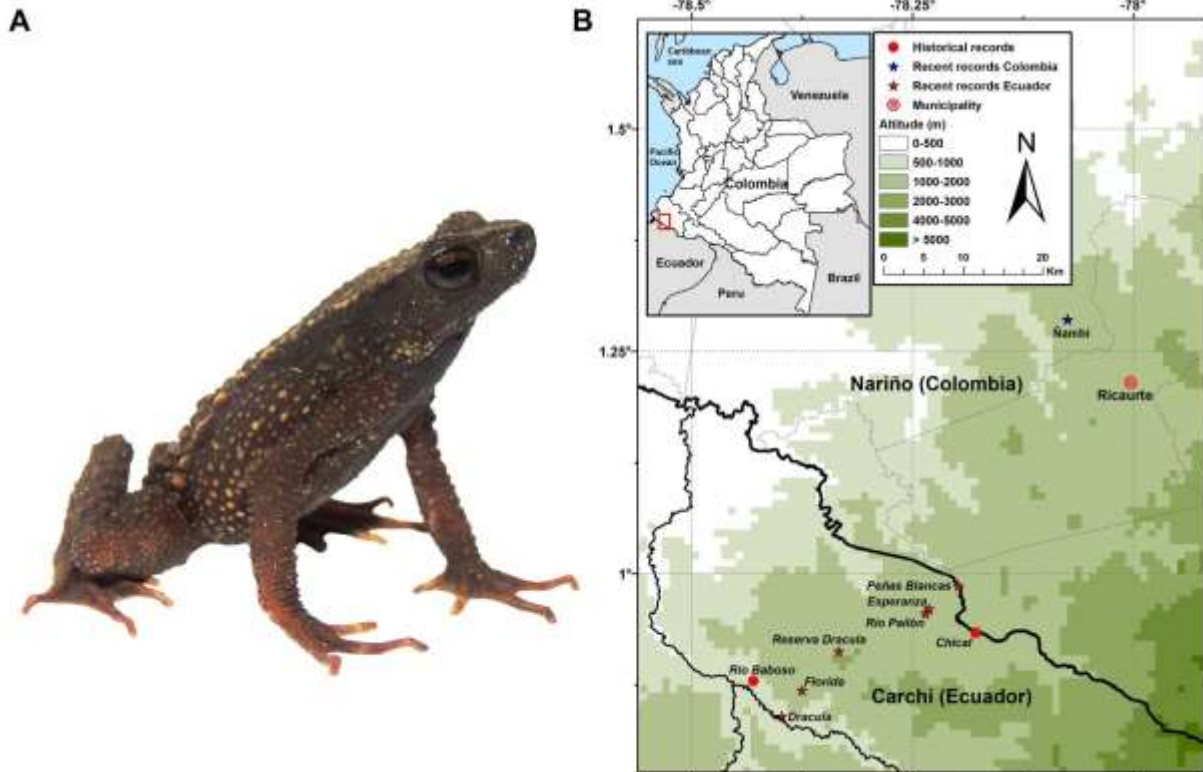
191 Los anfibios tienen características biológicas y ecológicas únicas que los hacen buenos modelos
192 de estudio en el campo de la filogeografía (Zeisset & Beebee, 2008; Rodríguez *et al.*, 2015; Beddek
193 *et al.*, 2018). Por ejemplo, la movilidad relativamente baja los hace ideales para estudiar barreras
194 a la dispersión, tanto antiguas como modernas, que son críticas para determinar el flujo de genes
195 y una estructura genética poblacional en distancias relativamente cortas (Beebee, 2005; Vitt &
196 Caldwell, 2014). Además, el efecto de las barreras físicas también puede restringir el límite de la
197 distribución de los anfibios, ya que estas están estrechamente relacionadas con factores
198 ambientales que varían con el diseño del paisaje (Beebee, 2005). Por otra parte, dado que los
199 anfibios son sensibles a cambios climáticos (e.g. niveles extremos en la temperatura y la humedad)
200 (Navas & Otani, 2007), y parecen tener un alto grado de conservadurismo de nicho (Wiens &
201 Graham, 2005), este grupo de organismos ofrece un excelente modelo para evaluar los efectos
202 diferenciales de los cambios climáticos que influyen en la distribución de especies (Mokhatla *et*
203 *al.*, 2015; Duan *et al.*, 2016; Velasco *et al.*, 2021).

204
205 Por lo anterior, una especie de anuro bufónido que resulta interesante como modelo de estudio es
206 *Rhaebo colomai* (Hoogmoed, 1985) (Fig. 1A). Esta especie tiene una distribución geográfica
207 restringida a la vertiente occidental de la región norte de los Andes, desde el suroeste de Colombia
208 hasta el noroeste de Ecuador, entre los 1100 y 1500 m (Ron *et al.*, 2015; Reyes-Puig *et al.*, 2019)
209 (Fig. 1B). *Rhaebo colomai* fue considerada como extinta en Ecuador debido a la falta de registros
210 en este país desde 1984 (Ron *et al.*, 2015; Varela-Jaramillo *et al.*, 2020), no obstante, Reyes-Puig
211 *et al.* (2019), con base en registros hechos entre 2016 y 2017, reportaron su redescubrimiento en
212 tres nuevas localidades en la provincia de Carchi, al norte de Ecuador (Fig. 1B). Los individuos
213 registrados por ellos coinciden con la descripción morfológica de la especie reportada por
214 Hoogmoed (1985,1989) y por Ron *et al.* (2015).

215
216 En Colombia, *R. colomai* únicamente se ha reportado en la Reserva Natural Río Ñambí -RNRÑ-
217 (municipio de Barbacoas, departamento de Nariño; Fig. 1B), habitando bosques secundarios y
218 cerca a quebradas sobre troncos y arbustos (Gutiérrez-Cárdenas, 2015; Ron *et al.*, 2015; *observ.*
219 *pers*). Un estudio de marca-recaptura realizado en la reserva entre los años 2014 y 2016 mostró
220 una fuerte asociación de los individuos a las quebradas donde se encuentran, al parecer, debido a

221 una limitada capacidad de dispersión entre ellas (Rojas-Rivera, *et al.*, *en prep*; Cortés-Bedoya,
222 2019).

223
224 Con base a lo anteriormente expuesto, este trabajo se compone de un capítulo, el cual fue
225 estructurado en dos partes:



226
227
228 **Figura 1.** *Rhaebo colomai* (A) y su distribución geográfica en Colombia y Ecuador (B). Los registros
229 históricos en Ecuador son de 1984 reportados por Hogmooed (1985, 1989). Los registros recientes
230 son posteriores a 2005 (Ron *et al.*, 2015; Reyes-Puig *et al.*, 2019). Coordenadas geográficas en Tabla
231 3.

232
233 La primera parte de este trabajo abarca el análisis de la biogeografía histórica de *Rhaebo colomai*,
234 incluyendo análisis de tiempos de divergencia, reconstrucción de rangos ancestrales, demografía
235 histórica y modelamiento de nicho. Para realizar el modelamiento, se evaluó la distribución
236 geográfica potencial de *R. colomai* para el período 1960-1990 y se transfirió el modelo a los
237 escenarios climáticos del Plioceno (hace 3.3 M.a) (Dolan *et al.*, 2015), y el LGM (*Last Glacial*
238 *Maximum*; hace 21 000 años) (Karger *et al.*, 2021). Los resultados del modelamiento fueron
239 integrados con los resultados de los análisis demográficos basados en ADN mitocondrial
240 (mtADN), con el fin de combinar el contexto histórico con el modelamiento de nicho de la especie

241 y así poder inferir qué factores climáticos determinaron la distribución de la especie. En la segunda
242 parte se presenta la caracterización de la variación genética y la estructura poblacional usando el
243 marcador mitocondrial COI (Citocromo Oxidasa I). Dado que las medidas de conservación se
244 aplican más fácil y rápidamente en escalas locales, este trabajo se enfocó en la búsqueda de
245 diferencias genéticas a una pequeña escala espacial en la RNRÑ, con el fin de proporcionar datos
246 de referencia para el manejo de la población de *R. colomai*.

247

248

BIBLIOGRAFÍA

- 249
250
251 **Allendorf FW, Luikart GH. 2007.** *Conservation and the genetics populations*. Maiden,
252 Massachusetts. USA: Blackwell.
- 253 **Alvarado-Serrano DF, Knowles LL. 2013.** Ecological niche models in phylogeographic studies:
254 applications, advances and precautions. *Molecular Ecology Resources* **14**: 233–248.
- 255 **Arbogast B, Kenagy GJ. 2001.** Comparative phylogeography as an integrative approach to
256 historical biogeography. *Journal Biogeography* **28**: 819–825.
- 257 **Avise JC. 2009.** Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- 258 **Avise JC, Arnold J, Ball RM Jr., Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders**
259 **NC. 1987.** Intra- specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population
260 genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489–522.
- 261 **Beebee TJC. 2005.** Conservation genetics of amphibians. *Heredity* **95**: 423–427.
- 262 **Beddek M, Zenboudji-Beddek S, Geniez P, Fathalla R, Sourouille P, Arnal V, Crochet PA.**
263 **2018.** Comparative phylogeography of amphibians and reptiles in Algeria suggests common
264 causes for the east-west phylogeographic breaks in the Maghreb. *Plos one* **13**: e0201218.
- 265 **Cortés-Bedoya S. 2019.** Dinámica poblacional de *Rhaebo colomai* (Hoogmoed 1985, Amphibia:
266 Bufonidae): amenazas y estrategias para su conservación en el suroccidente de Nariño,
267 Colombia. Unpublished Tesis de Maestría. Universidad de Manizales, Manizales.
- 268 **Dolan AM, Haywood AM, Hunter SJ, Tindall JC, Dowsett HJ, Hill DJ, Pickering SJ. 2015.**
269 Modelling the enigmatic late Pliocene glacial event—Marine Isotope Stage M2. *Global and*
270 *Planetary Change* **128**: 47–60.
- 271 **Domínguez-Domínguez O, Vázquez-Domínguez E. 2009.** Filogeografía: aplicaciones en
272 taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* **32**: 59–70.
- 273 **Duan RY, Kong XQ, Huang MY, Varela S, Ji X. 2016.** The potential effects of climate change
274 on amphibian distribution, range fragmentation and turnover in China. *PeerJ* **4**: e2185.
- 275 **Escudero AJ, Iriondo M, Torres ME. 2003.** Spatial analysis of genetic diversity as a tool for
276 plant conservation. *Biological Conservation* **113**: 351–365.
- 277 **Gutiérrez-Cárdenas PDA. 2015.** Anfíbios em uma floresta úmida da vertente pacífico ao
278 sudoeste da Colômbia: avaliação da diversidade e sistemática de espécies, e o uso de recursos
279 alimentares. Unpublished D. Phil. Thesis, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

280 **Hardy ME, Grady JM, Routman EJ. 2002.** Intraspecific phylogeography of the slender
281 madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of the United States.
282 *Molecular Ecology* **11**: 2393–2403.

283 **Hedrick PW. 2001.** Conservation genetics: Where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*
284 **16**: 629–636.

285 **Hoogmoed MS. 1985.** A new genus of toads (Amphibia: Anura: Bufonidae) from the Pacific
286 slopes of the Andes in northern Ecuador and southern Colombia, with the description of two
287 new species. *Zoologische Mededelingen* **59**: 251–274.

288 **Hoogmoed MS. 1989.** On the identity of some toads of the genus *Bufo* from Ecuador, with
289 additional remarks on *Andinophryne colomai* Hoogmoed, 1985 (Amphibia: Anura, Bufonidae).
290 *Zoologische Verhandlungen* **250**: 3–32.

291 **Karger DN, Nobis MP, Normand S, Graham CH, Zimmermann NE. 2021.** CHELSA-
292 TraCE21k V1.0. Downscaled transient temperature and precipitation data since the last glacial
293 maximum. *Climate of the Past Discussions*: 1–27.

294 **Mokhatla MM, Rödder D, Measey GJ. 2015.** Assessing the effects of climate change on
295 distributions of Cape Floristic Region amphibians. *South African Journal of Science* **111**: 1–7.

296 **Navas C, Otani L. 2007.** Physiology, environmental change, and anuran conservation.
297 *Phyllomedusa* **6**: 83–103.

298 **Neal KM, Johnson BB, Shaffer HB. 2018.** Genetic structure and environmental niche modeling
299 confirm two evolutionary and conservation units within the western spadefoot (*Spea*
300 *hammondi*). *Conservation Genetic* **19**: 937–946.

301 **Otto-Bliesner BL, Marshall SJ, Overpeck JT, Miller GH, Hu A, CAPE Last Interglacial**
302 **Project members. 2006.** Simulating Arctic climate warmth and icefield retreat in the last
303 interglaciation. *Science* **311**: 1751–1753.

304 **Pahad G, Montgelard C, Jansen van Vuuren B. 2020.** Phylogeography and niche modelling:
305 reciprocal enlightenment. *Mammalia* **84**: 10–25.

306 **Reyes-Puig C, Bittencourt-Silva GB, Sánchez MT, Wilkinson M, Streicher JW, Maddock**
307 **ST, Kotharambath R, Müller H, Angiolani Larrea FN, Almeida-Reinoso D, Ron SR,**
308 **Cisneros-Heredia DF. 2019.** Rediscovery of the endangered Carchi Andean Toad, *Rhaebo*
309 *colomai* (Hoogmoed, 1985), in Ecuador, with comments on its conservation status and
310 extinction risk. *Check List* **15**: 415–419.

- 311 **Richards CL, Carstens BC, Knowles LL. 2007.** Distribution modelling and statistical
312 phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative
313 biogeographical hypotheses. *Journal of Biogeography* **34**: 1833–1845.
- 314 **Rodríguez A, Börner M, Pabijan M, Gehara M, Haddad CF, Vences M. 2015.** Genetic
315 divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in
316 topographically complex regions. *Evolutionary Ecology* **29**: 765–785.
- 317 **Ron SR, Mueses-Cisneros JJ, Gutiérrez-Cárdenas PDA, Rojas-Rivera A, Lynch RL, Rocha
318 CFD, Galarza G. 2015.** Systematics of the endangered toad genus *Andinophryne* (Anura:
319 Bufonidae): phylogenetic position and synonymy under the genus *Rhaebo*. *Zootaxa* **3947**: 347–
320 366.
- 321 **Varela-Jaramillo A, Coloma LA, Frenkel C, Noboa F, Quiguango-Ubillús A. 2020.** *Rhaebo*
322 *colomai*. In: Ron SR, Merino-Viteri A, Ortiz DA, eds. Anfibios del Ecuador. Version 2021.0.
323 Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible:
324 <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Rhaebo%20colomai> (acceso 15 de
325 enero 2022).
- 326 **Velasco JA, Estrada F, Calderón-Bustamante O, Swingedouw D, Ureta C, Gay C, Defrance
327 D. 2021.** Synergistic impacts of global warming and thermohaline circulation collapse on
328 amphibians. *Communications Biology* **4**: 141.
- 329 **Vitt LJ, Caldwell JP. 2014.** *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*.
330 Fourth edition. London: Elsevier, 757 pp.
- 331 **Wiens JJ, Graham CH. 2005.** Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and
332 conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 519–539.
- 333 **Zeisset I, Beebee TJC. 2008.** Amphibian phylogeography: a model for understanding historical
334 aspects of species distributions. *Heredity* **10**: 109–119.

335
336
337
338
339
340

341 **CAPÍTULO 1. Historia evolutiva y estructura genética poblacional de *Rhaebo colomai***
342 **(Amphibia: Bufonidae), una especie amenazada de Colombia y Ecuador**

343
344 Alejandra Rojas-Rivera^{1,2}, Paul David Alfonso Gutiérrez-Cárdenas¹, Ghennie Tatiana Rodríguez
345 Rey^{1,3}

346
347 ¹ Grupo de Ecología y Diversidad de Anfibios y Reptiles, Universidad de Caldas, Calle 65 # 26-
348 10, Manizales, Caldas, Colombia.

349 ² Grupo de Investigación en Biología de la Conservación y Biotecnología, Corporación
350 Universitaria Santa Rosa de Cabal (UNISARC), km 4 vía Santa Rosa de Cabal–Chinchiná, Santa
351 Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia.

352 ³ Grupo de Investigación en Biodiversidad y Recursos Naturales, Universidad de Caldas, Calle 65
353 # 26-10 Manizales, Caldas, Colombia.

354
355 Revista: *Zoological Journal of the Linnean Society*

356 Estado: *En preparación*

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

RESUMEN

372
373
374 Las condiciones climáticas durante el Plioceno y el Pleistoceno afectaron la distribución, la
375 diversificación y la dinámica demográfica de los anfibios. Bajo esta premisa, combinamos
376 secuencias genéticas junto con reconstrucciones paleoclimáticas para evaluar el impacto de esas
377 oscilaciones sobre la biogeografía y demografía histórica del anuro *Rhaebo colomai*.
378 Adicionalmente, evaluamos la variabilidad y la estructura genética de esta especie presente en la
379 Reserva Natural Río Ñambí (Nariño, Colombia - RNRÑ), utilizando secuencias del gen
380 mitocondrial COI de individuos recolectados en cuatro transectos (tres quebradas y un bosque),
381 separados entre sí por distancias lineales entre 170–495 m. *Rhaebo colomai* divergió de su especie
382 hermana (*R. olallai*) hace ~3.1 M.a. durante el Plioceno en el área ancestral del sur de los Andes
383 del Norte en Ecuador. El área de distribución de *R. colomai* en la zona ecuatorial se comprimió
384 durante el *Last Glacial Maximum* (~34750–27900) formando refugios, en los cuales esta especie
385 sobrevivió. Posteriormente, ocurrió un evento de dispersión desde el área ancestral hacia
386 Colombia, donde la población de *R. colomai* en la RNRÑ experimentó una expansión demográfica
387 que inició hace ~12 980 años. Las secuencias genéticas analizadas de 40 individuos de Ñambí
388 mostraron una variabilidad genética total baja ($H = 0.276$; $\pi = 0.00238$) y un flujo génico restringido
389 entre los individuos de la quebrada dos y los demás sitios de muestreo debido probablemente a la
390 presencia de una franja de bosque amplia (2.9 ha) con una pendiente un poco pronunciada que
391 podría estar limitando el movimiento de los individuos hacia los demás transectos.

392
393 **Palabras clave:** *ADN mitocondrial – Demografía histórica – Estructura genética histórica – Last*
394 *Glacial Maximum – Modelamiento – Pleistoceno – Plioceno – Reserva Río Ñambí.*

395
396
397
398

399

1. INTRODUCCIÓN

400

401 La fluctuación paleoclimática asociada con los ciclos glaciares del Pleistoceno y la influencia de
402 la topografía, parecen haber jugado un papel importante en el modelamiento de los patrones de la
403 variación genética, la historia demográfica, la estructura genética poblacional y en los patrones de
404 especiación de los organismos (e.g. Hewitt, 1996, 2000, 2004; Avise, 2009; Yang *et al.*, 2009; Qiu
405 *et al.*, 2011). Por ejemplo, los ciclos glaciares y posglaciares en las regiones montañas afectaron
406 la demografía de las especies permitiendo que éstas se expandieran o contrajeran a lo largo de los
407 gradientes altitudinales (Vuilleumier, 1971; Hewitt, 2000, 2004; Nuñez *et al.*, 2011; Wang *et al.*,
408 2013).

409

410 Durante las glaciaciones pleistocénicas hubo un profundo impacto en la distribución altitudinal de
411 los cinturones de vegetación, los cuales contribuyeron a la fragmentación de las poblaciones y
412 eventualmente a procesos de especiación (Hooghiemstra & van der Hammen, 2004; Baker *et al.*,
413 2020). En los Andes colombianos, particularmente los bosques montanos, experimentaron la
414 mayor compresión en su rango altitudinal durante el *Last Glacial Maximum* (LGM) en el
415 Pleistoceno, hace cerca de 26–21 mil años (Peltier & Fairbanks, 2006), pasando de estar entre los
416 1000–2300 m a los 800–1400 m y reduciendo, por lo tanto, el rango altitudinal en un 55%
417 (Hooghiemstra & van der Hammen, 2004). No obstante, en los Andes ecuatorianos los glaciares
418 alcanzaron su máxima extensión hace cerca de 34.75–27.9 mil años (Heine, 2011). En las regiones
419 tropicales, en ese periodo, las caídas de temperatura fueron potencialmente heterogéneas y
420 acompañadas de cambios variables en la precipitación (Ramírez-Barahona & Eguiarte, 2013). Por
421 lo anterior, durante los periodos climáticos más fríos y secos del Pleistoceno los bosques se
422 fragmentaron en parches de bosque húmedos (llamados refugios), aislados entre sí por una matriz
423 de hábitat abierto y más seco (Haffer, 1969, 1982; Prance, 1982; Baker *et al.*, 2020). En tales
424 refugios se ha sugerido que las especies de bosques húmedos de las tierras bajas tropicales
425 persistieron (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970; Carnaval *et al.*, 2009).

426

427 Los efectos de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno en los hábitats montanos son más
428 evidentes en organismos que son altamente sensibles al cambio ambiental (Hewitt, 1996; Wiens,
429 2004; Wiens & Graham, 2005) y con capacidad de dispersión limitada por barreras físicas (grandes

430 cadenas montañosas o ríos) que pueden moldear la historia de las especies (Duellman & Trueb,
431 1994; Mendoza *et al.*, 2019; Santana-Cornélio *et al.*, 2020; de Carvalho *et al.*, 2021). Partiendo de
432 esas premisas, los anfibios son un excelente modelo para evaluar los efectos diferenciales de los
433 cambios climáticos del Pleistoceno sobre la distribución geográfica de las especies a lo largo de
434 un gradiente altitudinal (Zeisset & Beebee, 2008; Martínez-Monzón *et al.*, 2021; Fukutani *et al.*,
435 2022), porque poseen características fisiológicas que los hacen poco tolerantes a variaciones
436 ambientales (Navas & Otani, 2007; Wells, 2007; Dodd, 2009; Vitt & Caldwell, 2014), una piel
437 permeable que constantemente está sujeta a la desecación y, parecen ser evolutivamente
438 conservadores en la amplitud de su nicho ambiental (Wiens & Graham, 2005; Bandeira *et al.*,
439 2021).

440
441 Por otro lado, los anfibios comúnmente presentan distribuciones irregulares a lo largo del paisaje,
442 debido a la especificidad de sus hábitats y sus estrictos requisitos ecofisiológicos, (Allentoft &
443 O'Brien, 2010). Barreras físicas como grandes cadenas montañosas o ríos pueden limitar su
444 dispersión, además de moldear la historia de las especies (Duellman & Trueb, 1994).
445 Particularmente, las condiciones como la poca vagilidad y la alta filopatría a sitios natales
446 (Blaustein *et al.*, 1994), tienen el potencial de restringir el flujo génico y, por lo tanto, determinar
447 la existencia de estructuración genética en distancias geográficas tan pequeñas como 200 m (Cabe
448 *et al.*, 2007) o a distancias menores a 10 km (Burrowes & Joglar, 1999; Lampert *et al.*, 2003;
449 Robertson *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2013, 2018).

450
451 *Rhaebo colomai* (Anura: Bufonidae) (Fig. 1A) es una especie endémica de los Andes del Norte,
452 que habita los bosques tropicales de Colombia y Ecuador en elevaciones medias entre 1180–1500
453 m (Ron *et al.*, 2015; Reyes-Puig *et al.*, 2019; Yáñez-Muñoz *et al.*, 2020; Frost, 2021) (Fig. 1B).
454 *Rhaebo colomai* es la especie hermana *R. olallai* (Ron *et al.*, 2015). Al igual que otras especies de
455 *Rhaebo* (e.g. *R. ceratophrys*, *R. gutattus*, *R. haematiticus*, *R. nasicus*), esta especie posee rasgos
456 que pueden influir o limitar su capacidad de dispersión y su distribución espacial, entre ellos, la
457 dependencia a los cuerpos de agua lóticos (Van Bocxlaer *et al.*, 2010; Fenolio *et al.*, 2012; Mueses
458 *et al.*, 2012; Stynoski *et al.*, 2013). Aunque no se conocen los sitios de oviposición y el desarrollo
459 de huevos o larvas de *R. colomai*, su mayor abundancia a lo largo de las quebradas sugiere que se
460 reproduce en ellas (Ron *et al.*, 2015; Rojas-Rivera *et al.*, *en prep*), como sucede en *R. haematiticus*

461 (Coloma *et al.*, 2020) una especie cercanamente emparentada (Ron *et al.*, 2015). La única localidad
462 conocida en Colombia de *R. colomai* está presente en la Reserva Natural Río Ñambí (RNRÑ), al
463 suroccidente del departamento de Nariño (Fig. 1B), donde la mayoría de los individuos han sido
464 observados asociados a quebradas inmersas en los bosques (Ron *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta
465 que la mayoría de los adultos de esta especie parecen exhibir una alta fidelidad a las quebradas
466 donde se los observa es probable que ellos tengan una limitada capacidad de dispersión (Rojas-
467 Rivera *et al.*, *en prep*; Cortés-Bedoya, 2019). Debido a lo anterior, al interior de la RNRÑ puede
468 estar ocurriendo un patrón de estructuración genética a fina escala. Este trabajo sobre la
469 estructuración genética permitirá generar conocimiento sobre los patrones de dispersión a una
470 escala local de la especie, además de evaluar cómo difieren los niveles de la variabilidad genética
471 de los individuos presentes en las quebradas de la reserva.

472

473 De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se plantean las siguientes hipótesis de investigación:

474

475 1. Debido a las oscilaciones climáticas del Cuaternario, el rango geográfico de *R. colomai* sufrió
476 contracciones por el clima frío y seco durante los periodos glaciares, y expansiones asociadas
477 a crecimientos demográficos por climas más cálidos durante los periodos interglaciares.

478

479 2. La estructuración genética de *Rhaebo colomai* en RNRÑ está influenciada por la fidelidad de
480 la especie a las quebradas y a la distancia entre ellas, las cuales actúan como una barrera al flujo
481 génico.

482

2. MATERIALES Y MÉTODOS

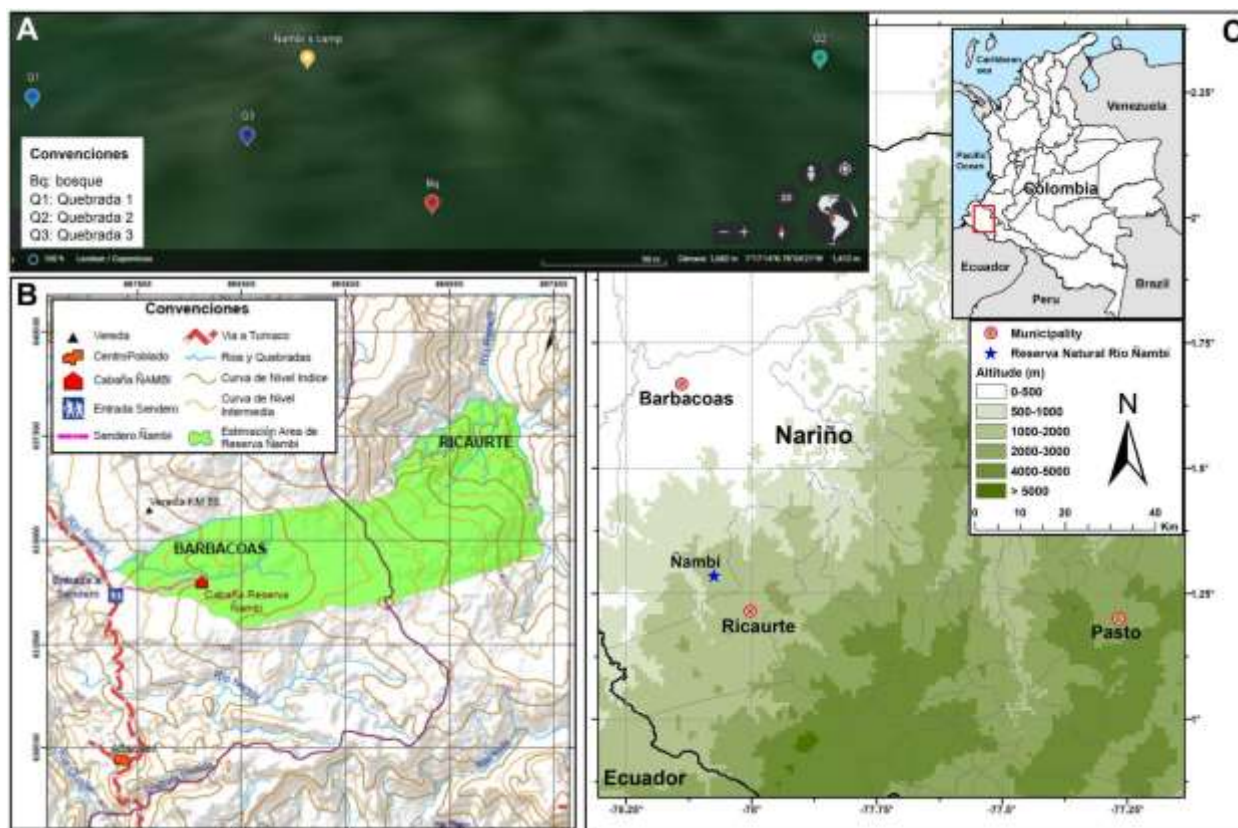
2.1. Área de estudio

La Reserva Natural Río Ñambí (RNRÑ; latitud 1.286280, longitud -78.074540, datum WGS84; 1100–1900 msnm), municipio de Barbacoas, Nariño (Fig. 2) hace parte de la zona hidrográfica Mira-Mataje, subcuenca del Río Güiza (Gómez *et al.*, 2017), y cuenta con distintos afluentes o quebradas (e.g. El Peje, Quebrada San Francisco, Quebrada La Sonora, y Quebrada El Espingo). La RNRÑ comprende zonas de vida entre bosque pluvial tropical y premontano (Holdridge, 1967; Gutiérrez *et al.*, 2004; Bacca & Flórez, 2019), áreas de bosque primario intervenido, secundario, borde y claros de bosque, inmersas en una matriz de bosque maduro que abarca 1500 ha entre los 1100–1900 msnm, con una precipitación anual promedio de 7160 mm y un patrón unimodal de lluvias (Salaman, 2001; Bacca & Flórez, 2019).

El área de estudio se dividió en cuatro sitios de muestreo, localizados entre 1407-1430 m: tres transectos de 200 x 2 m a lo largo de tres quebradas (Q), y un transecto en interior de bosque (Bq) de 100 x 2 m (Tabla 1A; Fig. 2A). Las distancias lineales entre los sitios de muestreo variaron entre 136–495 m (Tabla 1B). A cada individuo capturado se le registró su tamaño corporal LRC (Longitud Rostro-Cloaca), y estado de desarrollo (juvenil, subadulto y/o adulto) con base en Hoogmoed (1985,1989), Ron *et al.* (2015) y Reyes-Puig *et al.* (2019).

2.2. Recolección, extracción y amplificación de muestras

Las muestras de tejido de *R. colomai* se obtuvieron entre enero 2014 y julio 2016 de individuos capturados en recorridos nocturnos a lo largo de quebradas y en bosque, como parte de un proyecto alterno de monitoreo poblacional. El tejido se obtuvo mediante la técnica de corte de falanges (Donnelly *et al.*, 1994). Los individuos capturados fueron liberados inmediatamente después de la toma de la muestra en el punto de captura. A cada individuo que le fue cortada la falange, se le aplicó una crema antifúngica para evitar cualquier infección posterior. Los tejidos fueron preservados en etanol al 97% y almacenados a -20 °C.



514
 515 **Figura 2.** Localización de los sitios de muestreo (A) en la Reserva Natural Río Nambí (B) en el
 516 departamento de Nariño, Colombia (C). Fuente figura B: Bacca & Flórez, 2019.
 517

518 **Tabla 1.** (A) Características (coordenadas geográficas, altitud, cantidad (N) de individuos registrados
 519 y número de secuencias obtenidas (COI) del gen Citocromo Oxidasa I de los cuatro sitios de muestreo
 520 de *Rhaebo colomai* en la Reserva Natural Río Nambí, Barbacoas (Nariño, Colombia); (B) distancia
 521 (m) entre pares de sitios de muestreo. Quebrada (Q), Bosque (Bq).
 522

A. Características						B. Distancias	
Sitios de muestreo	Latitud	Longitud	Altitud (m)	N	COI	Par	Distancia (m)
Quebrada 1 (Q1)	1.28639	-78.07575	1407	17	11	Q1-Q2	495
Quebrada 2 (Q2)	1.28622	-78.07133	1440	25	10	Q1-Q3	170
Quebrada 3 (Q3)	1.28579	-78.07438	1408	27	12	Q1-Bq	301
Bosque (Bq)	1.28500	-78.07347	1430	12	7	Q2-Q3	342
Total				81	40	Q2-Bq	275
						Q3-Bq	136

523
 524 En el Laboratorio de Colecciones Biológicas de la Universidad de Caldas (Manizales, Colombia)
 525 se extrajo el ADN genómico (ADNg) de 40 muestras de tejido de *R. colomai* de las 81 muestras
 526 recolectadas en la RNRÑ (Tabla 1A). El ADNg fue obtenido mediante el protocolo de extracción
 527 de sales (modificado de Miller *et al.*, 1988), el cual consistió en homogeneizar el tejido en 500 µl

528 de solución de lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1%, NaCl 50 mM, pH 8) junto con 3
529 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). La solución homogeneizada fue incubada por 3 h a 55 °C. Los
530 restos celulares se separaron por centrifugación a 14 000 rpm durante 15 min y luego se
531 transfirieron 500 μ l del sobrenadante a otro tubo al cual se le adicionaron 300 μ l de NaCl 5M para
532 precipitar las proteínas. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas durante 10 min a 14
533 000 rpm. El ADNg fue precipitado luego de transferir a un nuevo tubo 600 μ l del sobrenadante
534 con 600 μ l de isopropanol para ser almacenado durante toda la noche a -20 °C. Posteriormente, se
535 centrifugaron las muestras durante 30 min a 14 000 rpm. El *pellet* fue lavado dos veces con 600 μ l
536 de etanol frío al 70% y centrifugado a 14 000 rpm durante 10 min para retirar el exceso de sal.
537 Seguido de esto, las muestras se dejaron secar en la mesa durante 3 h aproximadamente. Luego, el
538 ADN se resuspendió en 50 μ l de TE y se incubó durante 20 min a 37 °C. Finalmente, se agregaron
539 2 μ l de RNase (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 20 min.

540
541 La integridad del ADNg extraído se verificó posteriormente mediante electroforesis en gel de
542 agarosa al 0.8%, usando una solución amortiguadora de Tris-borato EDTA (TBE) teñida con 2 μ l
543 de HydraGreen (0.5 mg/L). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb Plus Opti-DNA
544 Marker de ABM. La corrida se realizó a 70 V durante 50 min. La cuantificación del ADN fue
545 determinada por espectrofotometría (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) y la pureza se obtuvo
546 mediante la relación A260/A280 y A260/A230 siguiendo la metodología de Clark & Christopher
547 (2001). Finalmente, para estandarizar la concentración de ADNg, las muestras fueron
548 normalizadas con una disolución en TE con el fin de obtener una concentración final de 40 ng/ μ L.
549 Las extracciones de ADNg fueron almacenadas a -20 °C.

550
551 Mediante PCR se amplificó un fragmento de la región del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa
552 subunidad I (COI), empleando los *primers* AnF1 (5' ACH AAY CAY AAA GAY ATY GG 3') y
553 AnR1 (5' CCR AAR AAT CAR AAD ARR TGT TG 3') diseñados por Lyra *et al.* (2016) para
554 diferentes especies de anfibios. En cada reacción de amplificación se usaron 2 μ l de ADNg
555 utilizando el MasterMix Taq-&LOAD™ Buffer 5X, 1.5 mM de MgCl₂, y 0.25 μ M de cada primer,
556 en un volumen final de 20 μ L. Las posibles contaminaciones se detectaron incluyendo controles
557 negativos. La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de
558 desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos que comprendían desnaturalización

559 a 95°C durante 30 min, hibridación a 48°C por 35 s, y extensión a 68 °C durante 50 s, seguido de
560 una extensión final de 5 min a 68 °C.

561
562 Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2.0% para
563 determinar la calidad y cantidad del fragmento siguiendo el protocolo de visualización de
564 extracción de ADN_g mencionado arriba. Los fragmentos amplificados fueron purificados y
565 secuenciados en ambas direcciones por Macrogen, Inc., Corea. Los electroferogramas obtenidos
566 fueron editados y ensamblados con el programa SeqMan II 4.0 (DNASTAR Inc.), y las secuencias
567 fueron alineadas utilizando el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en el
568 programa Mega 7.0 (Tamura *et al.*, 2016). Los alineamientos fueron inspeccionados visualmente
569 y traducidos para identificar errores de edición y presencia de codones de parada que reflejaran la
570 amplificación de NuMts (secuencias mitocondriales nucleares).

571

572 **2.3. Historia evolutiva**

573

574 **Tiempos de divergencia y reconstrucción de áreas ancestrales**

575

576 El análisis filogenético se realizó usando 112 secuencias de la familia Bufonidae obtenidas del
577 GenBank (Tabla S1). Cuatro genes mitocondriales (CXCR4, NAD2, 12S y 16S) y un gen nuclear
578 (RAG1) fueron utilizados, siguiendo a Pramuk *et al.* (2008), Ron *et al.* (2015), Fong *et al.* (2020)
579 y Pereyra *et al.* (2021). *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) fue la especie utilizada
580 para enraizar el árbol (Tabla S1). Las secuencias fueron alineadas para cada gen mediante el
581 algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa Mega 7.0 (Tamura *et al.*, 2016), y
582 posteriormente chequeadas manualmente. Las regiones con baja homología fueron eliminadas del
583 alineamiento, siguiendo a Pramuk *et al.* (2008). Finalmente, se construyó una matriz concatenada
584 para los cinco genes usando el programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2010). El mejor
585 esquema de partición y modelo de sustitución se determinó para el conjunto de genes a partir del
586 criterio de información Bayesiano (BIC – Bayesian Information Criterion), usando Partition
587 Finder 2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012). El mejor esquema de sustitución y modelo de partición fue:
588 CXCR4: TVM+I+G; NAD2: TVM+I+G; 16S, y 12S: GTR+I+G; y RAG1: TRN+I+G.

589

590 Los tiempos de divergencia se estimaron bajo un enfoque bayesiano implementado en el programa
591 Beast 1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2007), usando tres puntos de calibración definidos por
592 Pramuk *et al.* (2008), Portik & Papenfuss (2015) y Fong *et al.* (2020), de la siguiente manera:

- 593
- 594 1. Familia Bufonidae del Viejo Mundo (Báez & Gasparini, 1979): distribución exponencial, mean
595 = 20, log (SD) = 1, offset = 57.
 - 596 2. División entre Norte y Centro América basada en el fósil de *Incilius praeivius* (Tihen, 1965;
597 *Bufo praeivius auctorum*): distribución log normal, mean = 10, log (SD) = 1, offset = 19.
 - 598 3. Origen del grupo *Rhinella marina* (Sanchíz, 1998): distribución log normal, mean = 10, log
599 (SD) = 1, offset = 10.

600

601 Un modelo de reloj molecular relajado con distribución log normal fue empleado y se consideró
602 el modelo evolutivo de especies de Yule (Heled & Drummond, 2012). Los análisis fueron corridos
603 para 100 millones de generaciones muestreadas cada 10 000 generaciones, donde el intervalo de
604 confianza (95%) de la posición relativa de los nodos corresponde a los límites superior e inferior
605 dados en millones de años (M.a.). La convergencia de las cadenas y la estimación de los parámetros
606 fue verificada con el programa Tracer 1.5 (Drummond & Rambaut, 2007). Finalmente, se utilizó
607 el programa TreeAnnotator v1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007) para obtener el árbol de máxima
608 credibilidad después de descartar el 25% de los árboles generados. El árbol generado fue
609 visualizado y editado mediante el programa FigTree 1.4.2 (Rambaut, 2014). Los análisis con Beast
610 fueron ejecutados en CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2012).

611

612 Se reconstruyeron las áreas ancestrales de siete especies del género *Rhaebo* (*R. ceratophrys*, *R.*
613 *colomai*, *R. ecuadorensis*, *R. guttatus*, *R. haematiticus*, *R. nasicus* y *R. olallai*) con secuencias
614 disponibles en GenBank. Las secuencias de las especies se obtuvieron como un subset del
615 alineamiento empleado para la realización del análisis de tiempos de divergencia mencionado
616 anteriormente. El árbol filogenético se obtuvo empleando el método de Inferencia Bayesiana (IB)
617 con el programa MrBayes 3.2.0 (Ronquist *et al.*, 2012) en la plataforma CIPRES Science Gateway
618 3.3 (Miller *et al.*, 2012; <https://www.phylo.org/index.php/>). Se empleó para este análisis una
619 corrida de cuatro cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), cada una con 15 millones de
620 generaciones y una frecuencia de muestreo cada 1000 generaciones. El primer 25 % de los árboles

621 se descartó como *burn-in* y se obtuvo un árbol consenso por mayoría del 50 %. La convergencia
622 de las cadenas fue verificada con el programa Tracer v.1.6 (Rambaut *et al.*, 2014). El árbol
623 obtenido por IB se utilizó como topología del árbol en el que se mapearon las áreas ancestrales.

624
625 Para la reconstrucción de las áreas ancestrales se utilizó el análisis de Dispersión-Vicarianza DIVA
626 (S-DIVA) implementado en el programa Rasp 4 (Yu *et al.*, 2020), donde una matriz de costos fue
627 construida para calcular el escenario biogeográfico óptimo para el grupo estudiado (Ronquist,
628 1997). Para definir la distribución actual de la especie e inferir las áreas ancestrales, se usaron seis
629 áreas geográficas siguiendo la clasificación por regiones biogeográficas de Duellman (1999) y
630 Hutter *et al.*, (2017) las cuales representan áreas importantes de diversidad y endemismos de
631 anfibios, y tres áreas geográficas de acuerdo con Morrone (2014) donde se detallan las provincias
632 del Caribe (Tabla 2). Con el fin de estimar con mayor precisión la ruta de diversificación y
633 colonización de *R. colomai*, la región de los Andes del Norte fue subdividida en Norte Andes del
634 Norte (NAN, Colombia) y Sur Andes del Norte (SAN, Ecuador). Esta división tuvo en cuenta la
635 cuenca del río Mira en el norte de Ecuador, ya que ésta ha sido reconocida como una importante
636 barrera de aislamiento para pequeños vertebrados en el occidente del Ecuador (Arteaga *et al.*,
637 2016; Yáñez-Muñoz *et al.*, 2021). Los 15 000 árboles obtenidos del análisis de MrBayes fueron
638 empleados como árboles de entrada para el análisis S-DIVA y las indicaciones ejecutadas fueron:
639 áreas máximas en cada nodo = cuatro; máximo número de reconstrucciones = 1000; y peso = 1.

640

641 **Historia demográfica**

642

643 Inicialmente se hicieron pruebas para determinar si las secuencias del gen mitocondrial COI de *R.*
644 *colomai* presentaron desvíos significativos en relación con el equilibrio deriva génica y mutación.
645 Desvíos en relación con la neutralidad pueden ser producidos por selección o por eventos
646 demográficos (expansión o reducción poblacional). Para esto se estimaron los estadísticos *D* de
647 Tajima (Tajima, 1989), *F_s* de Fu (Fu, 1997) y *R₂* (Ramos-Onsis & Rozas, 2002). Si las poblaciones
648 se han mantenido estables por largos periodos de tiempo, los valores de estos estadísticos son
649 cercanos a cero. Por otro lado, desviaciones significativas respecto al cero permiten rechazar la
650 hipótesis de estabilidad poblacional (Tajima, 1989; Fu, 1997). Los valores negativos, para el *F_s*
651 de Fu y el *D* de Tajima, indicarían que las poblaciones experimentaron procesos de expansión

652 poblacional (i.e. los alelos raros son más frecuentes de lo esperado), mientras que valores positivos
 653 indicaría que la población atravesó un cuello de botella (i.e. los alelos raros son menos frecuentes
 654 de lo esperado) (Tajima, 1989; Fu, 1997). Los estadísticos D de Tajima y F_s de Fu se estimaron
 655 usando el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) y la prueba R_2 fue implementada
 656 en DnaSP 6.0. Las pruebas de neutralidad y los análisis de inferencia demográfica se realizaron
 657 considerando únicamente las secuencias del COI del grupo Q1/Q3/Bq, ya que todos los análisis
 658 demográficos consideran el supuesto de panmixia para sus análisis (Tajima, 1989; Fu, 1997;
 659 Ramírez-Soriano, 2008).

660

661 **Tabla 2.** Regiones biogeográficas utilizadas para indicar la distribución de las especies del género
 662 *Rhaebo* en América Central y América del Sur.
 663

Continente	Región biogeográfica	Código
América del Sur	Amazonía	A
América del Sur	Norte Andes del Norte	NAN
América del Sur	Sur Andes del Norte	SAN
América del Sur	Cerrado	C
América del Sur	Chocó	Ch
América del Sur	Guyana	G
América Central	Mosquito	M
América Central	Guatuso-Talamanca	GT
América Central	Puntarenas-Chiriquí	PC

664

665 Adicionalmente, los cambios demográficos temporales fueron evaluados a través del análisis
 666 *Mismatch Distribution Analysis* (Rogers & Harpending, 1992). Cuando la distribución es de tipo
 667 bimodal, las muestras provienen de una población que se ha mantenido en equilibrio demográfico
 668 suficiente tiempo, mientras que una distribución unimodal indica que la población ha
 669 experimentado procesos de expansión poblacional o expansión de la distribución geográfica con
 670 altos niveles de flujo genético entre poblaciones próximas (Rogers & Harpending, 1992; Ray *et*
 671 *al.*, 2003). Los parámetros e intervalos de confianza para el análisis de distribución de las
 672 diferencias fueron estimados usando el programa Arlequin 3.5.2.2, bajo el modelo de expansión
 673 demográfica y expansión espacial.

674

675 Adicionalmente, se realizó un *Bayesian Skyline Plot* (BSP; Drummond & Rambaut, 2007) con el
 676 fin de detectar, sin ambigüedades, los cambios en el tamaño efectivo de la población a lo largo del
 677 tiempo, señales o firmas genéticas de decline o expansión demográfica. El BSP fue realizado con

678 el programa Beast 1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018). El modelo de sustitución para el fragmento del
679 gen COI fue Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), identificado este a través del criterio de
680 información Bayesiano (BIC) implementado en Mega 7.0. Los análisis asumieron un reloj
681 molecular estricto, 10 grupos de intervalos y un modelo de tamaño constante por intervalos. La
682 tasa de sustitución empleada fue de 1.0% por millones de años (Elmer *et al.*, 2007). Se realizaron
683 cinco corridas de MCMC (métodos de Montecarlo basados en cadenas de Markov) de 60 millones
684 de generaciones, las cuales fueron combinadas con LogCombiner 1.10.4. Por último, el programa
685 Tracer 1.5 fue usado para verificar la convergencia de las cadenas y obtener la gráfica de la historia
686 demográfica descartando el primer 10% de los árboles como *burn-in*.

687

688 **Modelamiento de nicho**

689

690 El modelo de nicho para *Rhaebo colomai* fue generado usando los registros publicados de
691 presencia de la especie (Tabla 3) y 14 capas bioclimáticas obtenidas desde Worldclim (Hijmans *et*
692 *al.*, 2005), las cuales corresponden a variables mensuales de temperatura y precipitación para el
693 período entre 1960-1990 (resolución de 30 arco-segundos). El modelamiento fue implementado
694 con el paquete *sdm* en R (Naimi & Araújo, 2016). Antes de generar el modelo, se calculó el
695 coeficiente de correlación de Pearson entre cada una de las variables bioclimáticas, así como el
696 factor de inflación de la varianza (VIF) con el fin de identificar la colinealidad entre las variables
697 bioclimáticas. Las variables correlacionadas con un $r > 0.7$ y un valor de VIF mayor a 10 fueron
698 excluidas (Naimi *et al.*, 2014). Seguido de esto, se creó aleatoriamente un conjunto de 100 000
699 pseudo-ausencias o puntos de background a través de una región en el suroccidente de Colombia
700 y noroccidente de Ecuador. Posteriormente, se evaluaron cuatro algoritmos estadísticos
701 *Generalized linear models* (GLM: McCullagh & Nelder, 1983), *Boosted regression tree* (BRT:
702 Friedman, 2001), *Maximum entropy* (Maxent: Phillips *et al.*, 2006), y *Random Forest* (RF:
703 Breiman, 2001) con el fin de generar cada uno de los modelos. Cada modelo fue calibrado
704 realizando un submuestreo mediante el método “*Cross-validate*” con $k\text{-folds} = 8$. Con el fin de
705 evaluar la eficiencia de los modelos individuales y compararlos entre sí, se utilizó los estadísticos
706 *Area Under the Curve* (AUC) y *True Skill Statistic* (TSS) (Elith *et al.*, 2006) con un esquema de
707 partición de datos de 70/30 (70% *Training* y 30% *Testing*). Según el AUC, un modelo es
708 considerado como bueno si la línea de prueba se ubica cerca del tope superior izquierdo, dado que

709 tiene mayor capacidad de predecir las presencias contenidas en la muestra de prueba de datos. Se
 710 obtiene una curva de sensibilidad vs. especificidad con un rango de valores desde 0.5 (al azar) a
 711 1.0 (discriminación perfecta). Usualmente, los valores de AUC entre 0.5–0.7 indican una
 712 confiabilidad baja; entre 0.7–0.9 una aplicación útil del modelo; y mayores que 0.9 una
 713 confiabilidad alta (Hanley & McNeil, 1982; Manel *et al.*, 2001). Los valores del estadístico TSS
 714 varían de -1 a 1, donde 1 indica un modelo perfecto y los valores inferiores a 0 indican una
 715 confiabilidad baja (Allouche *et al.*, 2006). El modelo con mejor desempeño fue transferido a dos
 716 escenarios climáticos pasados disponibles en Paleoclim (Brown *et al.*, 2018): Plioceno (hace ~3
 717 250 000 años) (Dolan *et al.*, 2015) y *Last Glacial Maximum* (LGM: hace ~21 000 años) (Karger
 718 *et al.*, 2021).

719
 720 Los modelos de nicho pueden ser sensibles a la distribución de gradientes ambientales en el área
 721 de estudio y proyectar modelos fuera del área de entrenamiento, lo que puede generar una
 722 extrapolación más allá del rango de referencia de uno o más predictores ambientales (Mandle *et*
 723 *al.*, 2010; Parida *et al.*, 2015). Para evitar la incertidumbre causada por la extrapolación de modelos
 724 fuera de los valores climáticos analizados se utilizó el índice MESS (*Multivariate Environmental*
 725 *Similarity Surface*; Elith *et al.*, 2010). El índice evalúa la disimilitud en las condiciones climáticas
 726 pasadas (e.g. Plioceno y LGM) con respecto al clima actual utilizando las 14 capas bioclimáticas.
 727 Los valores negativos indican climas no análogos y los valores positivos indican condiciones
 728 climáticas similares (Broennimann *et al.*, 2014). Este análisis fue generado mediante el paquete
 729 *dismo* en R (Hijmans *et al.*, 2014)

730 **Tabla 3.** Localidades registradas para *Rhaebo colomai* en Colombia (COL) y Ecuador (ECU).
 731

Localidad	Latitud	Longitud	Fuente
Reserva Natural Río Ñambí (COL)	1.28500	-78.07347	Ron <i>et al.</i> (2015)
Peñas Blancas (ECU)	0.98667	-78.19767	Reyes-Puig <i>et al.</i> (2019)
Río Pailón (ECU)	0.95583	-78.23533	Reyes-Puig <i>et al.</i> (2019)
Chical (ECU)	0.93420	-78.17830	Hogmoed (1985)
Reserva Drácula (ECU)	0.91300	-78.33333	Reyes-Puig <i>et al.</i> (2019)
Río Baboso (ECU)	0.88000	-78.43000	Hogmoed (1985,1989)
Florida (ECU)	0.86941	-78.37502	iNaturalist (2022a)
Reserva Drácula (ECU)	0.84007	-78.39797	iNaturalist (2022b)

732

733

734

735
736

Tabla 4. Lista de variables bioclimáticas utilizadas en los modelos de nicho de *Rhaebo colomai*.

Código	Variables	Código	Variables
BIO1	Temperatura promedio anual	BIO11	Promedio temperatura diaria del trimestre más frío
BIO2	Rango de temperatura promedio diurna del aire	BIO12	Cantidad de precipitación anual
BIO3	Isotermalidad	BIO13	Cantidad de precipitación mes más húmedo
BIO4	Estacionalidad de la temperatura	BIO14	Cantidad de precipitación mes más seco
BIO5	Temperatura promedio diaria máxima del mes más cálido	BIO15	Estacionalidad de la precipitación
BIO6	Temperatura promedio diaria máxima del mes más frío	BIO16	Promedio precipitación diaria del trimestre más húmedo
BIO7	Rango anual de temperatura del aire	BIO17	Promedio precipitación diaria del trimestre más seco
BIO8	Promedio temperatura diaria del trimestre más húmedo	BIO18	Promedio precipitación diaria del trimestre más cálido
BIO9	Promedio temperatura diaria del trimestre más seco	BIO19	Promedio precipitación diaria del trimestre más frío
BIO10	Promedio temperatura diaria del trimestre más cálido		

737

738 **2.4. Estructuración genética y variabilidad poblacional de *Rhaebo colomai* en Colombia**

739

740 Los análisis de variabilidad y estructuración genética se realizaron utilizando el gen mitocondrial
741 COI. La variabilidad genética intraespecífica se estimó utilizando el número de haplotipos
742 observados (N_H), los índices de diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y el número
743 de sitios polimórficos (s). Estos índices fueron calculados mediante el programa DnaSP 6.0 (Rozas
744 *et al.*, 2017). Adicionalmente, las relaciones genealógicas entre haplotipos se evaluaron
745 construyendo una red a través del método Median-Joining (MJ) implementado en el programa
746 PopART (Leigh & Bryant, 2015).

747

748 El índice de fijación F_{ST} par-a-par y su análogo (ϕ) Φ_{ST} fueron calculados para determinar el
749 grado de diferenciación entre las localidades. Mediante 10 000 permutaciones se evaluó la
750 significancia estadística para estos análisis y el nivel de significancia se ajustó empleando la
751 corrección FDR (Benjamini & Hochberg, 1995). Adicionalmente, se realizó el análisis jerárquico
752 de la varianza molecular (AMOVA), el cual considera las distancias genéticas entre los haplotipos
753 y sus frecuencias para estimar la varianza y los índices de fijación Φ , análogos a los estadísticos
754 F . Los índices F consideran las frecuencias de los haplotipos mientras que los índices Φ consideran

755 la diversidad nucleotídica (Excoffier *et al.*, 1992). Tales índices se emplean para resumir el grado
756 de diferenciación entre las poblaciones a tres niveles: dentro de los grupos (F_{ST} o Φ_{ST}); entre las
757 poblaciones dentro de los grupos (F_{SC} o Φ_{SC}) y entre los grupos (F_{CT} o Φ_{CT}), a través de un sistema
758 de permutaciones no paramétricas que reflejan las subdivisiones geográficas más probables
759 (Excoffier *et al.*, 1992).

760
761 Los anteriores análisis se evaluaron teniendo en cuenta todos los puntos de muestreo como una
762 única población panmíctica y se probaron diferentes escenarios de estructuración entre las tres
763 quebradas Q y el bosque Bq. Valores altos y significativos de Φ_{ST} indican una diferenciación de
764 la población local, sugiriendo fuertes efectos de la deriva génica y bajo intercambio de migrantes
765 con el resto de las localidades muestreadas (Excoffier *et al.*, 1992). Los análisis sobre
766 estructuración poblacional se realizaron con el software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer,
767 2010).

768
769 Adicionalmente, el número de poblaciones posibles (K posible) a partir de un algoritmo bayesiano
770 se infirió utilizando el programa Baps 6.0 (Corander *et al.*, 2013). Este método se basa en la
771 información genética para asignar a cuál población pertenece un individuo, sin suponer
772 poblaciones predefinidas, donde el número de poblaciones está dado bajo el supuesto de panmixia
773 (Corander *et al.*, 2013). Para esto se probaron varios números de poblaciones (K = 2; K = 3; K =
774 4), cada una con 15 réplicas en un análisis único. Se escogió el parámetro de verosimilitud para
775 escoger el K más probable (Corander *et al.*, 2013).

776
777 Finalmente, con una prueba de Mantel, usando el paquete “Vegan” (Oksanen *et al.*, 2013) para R
778 (Core Team, 2021), se evaluó si las poblaciones de *R. colomai* siguen un patrón de aislamiento por
779 distancia. Esto fue evaluando la correlación entre los valores de Φ_{ST} y de F_{ST} con la distancia
780 geográfica estimada entre cada punto de muestreo de la reserva.

781

3. RESULTADOS

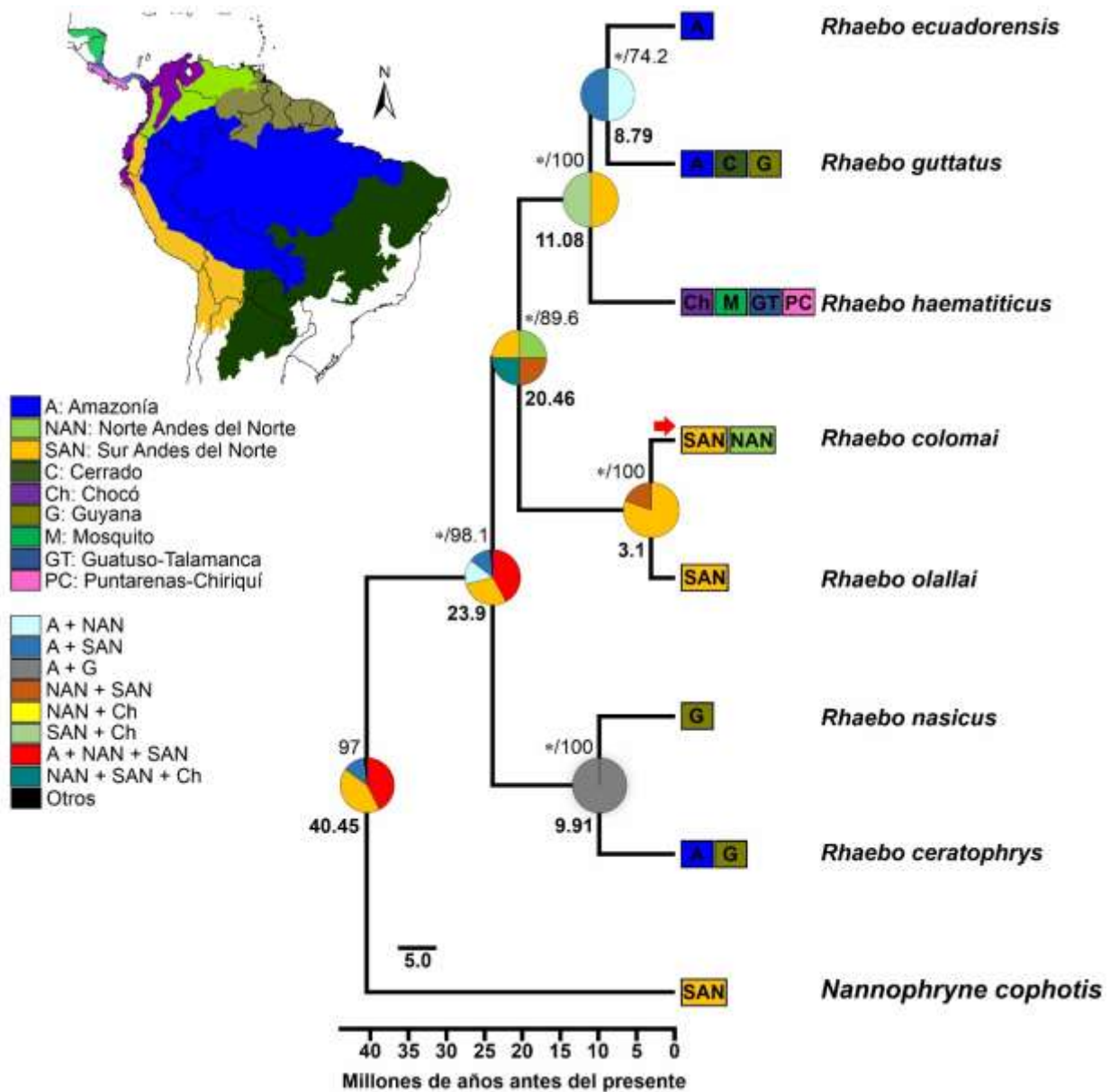
3.1. Historia evolutiva

Tiempos de divergencia y reconstrucción de áreas ancestrales

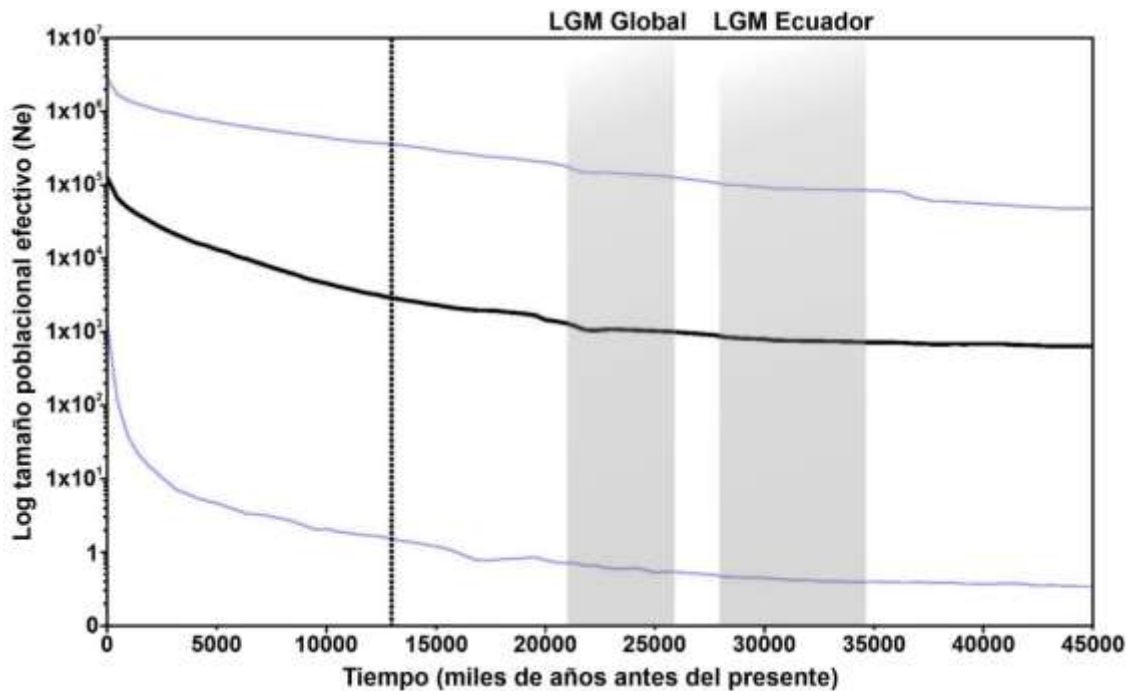
La probable área de distribución del ancestro común más reciente del género *Rhaebo*, el cual diversificó hacia al final del Oligoceno hace ~23.9 M.a. (intervalo de confianza 95%: 17.5–31.1), fue en el área conformada por las regiones biogeográficas de la Amazonía (A), el norte de los Andes del Norte (NAN) y el sur de los Andes del Norte (SAN) (probabilidad posterior de 0.42) según el análisis S-DIVA (Fig. 3). En particular para este estudio, la divergencia de *R. colomai* de su especie hermana *R. olallai* sucedió hace ~3.1 M.a. (intervalo de confianza 95%: 1.2–5.8) durante el Plioceno, en el área ancestral SAN (probabilidad posterior de 0.80) (Fig. 3). Luego, mediante un evento de dispersión, *R. colomai* colonizó el NAN (Fig. 3).

Historia demográfica

El marcador COI presentó un desvío significativo de la hipótesis de neutralidad debido probablemente a que la población experimentó un proceso de expansión poblacional (F_s de Fu = -1.211; $P < 0.05$, D de Tajima = -1.1470; $P < 0.05$ y $R_2 = 0.1639$; $P < 0.05$). El análisis de *Mismatch Distribution Analysis* para el marcador COI reveló que los índices SSD (suma de cuadrados de los desvíos) y r (índice “Raggedness”) no rechazaron la hipótesis de expansión demográfica ($SSD = 0.039$ $P > 0.05$; $r = 0.505$ $P > 0.05$) y espacial ($SSD = 0.019$ $P > 0.05$; $r = 0.505$ $P > 0.05$). Adicionalmente, el análisis del *Bayesian Skyline Plot* mostró que el tiempo de coalescencia de las secuencias fue hace ~ 12 980 años (intervalo de confianza 95%: 12 000–45 000 años), momento desde el cual inició la expansión demográfica de la población colombiana posterior al LGM en Ecuador (~34 750–27 900 años) y el LGM global (~26 000–21 000 años) (Fig. 4).



813
 814
 815
 816
 817
 818
 819
 820
 821
 822
 823
 824
 825
 826



827
828
829
830
831
832
833
834
835

Figura 4. Bayesian Skyline Plot (BSP) derivado de las secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) para *Rhaebo colomai*. La estimación de la media del tamaño poblacional se muestra como una línea sólida gruesa y los límites de confianza del 95 % están representados como líneas azules. La línea punteada corresponde al tiempo de coalescencia de las secuencias y, así mismo, al inicio aproximado del tiempo de expansión poblacional de la especie (~ 12 980 años). En barras grises se indica el período de duración del LGM en el Ecuador y el LGM global.

836 **Modelamiento de nicho**

837

838 Al realizar la evaluación de los modelos para *R. colomai*, el algoritmo que mejor desempeño
839 obtuvo fue Maxent (AUC > 0.9, TSS > 0.7; Tabla 5). Las variables de mayor importancia para la
840 realización del modelamiento fueron la temperatura promedio en el trimestre más seco, la
841 precipitación en el trimestre más frío y la estacionalidad de la temperatura y la precipitación (Fig.
842 5). Los modelos de transferencia a los escenarios climáticos del Plioceno y el LGM sugieren que
843 el hábitat con la mayor idoneidad climática para *Rhaebo colomai* se encontraba en la zona del
844 Ecuador (Fig. 6B-C). Sin embargo, durante el Plioceno el escenario climático muestra una
845 adecuabilidad alta que abarca el noroccidente de Ecuador hasta el suroccidente de Colombia (Fig.
846 6C), contrario a lo sucedido en el periodo del LGM donde el nicho climático para la especie se
847 fragmentó y se comprimió hacia la zona ecuatorial (Fig. 6B).

848

849 El análisis MESS muestra que las características climáticas durante el Plioceno y el LGM fueron
 850 similares con la actualidad (Fig. 7A-B), lo que indica un conservadurismo de nicho climático en
 851 toda la región del noroccidente del Ecuador y suroccidente de Colombia para *Rhaebo colomai* en
 852 periodos históricos y actuales.

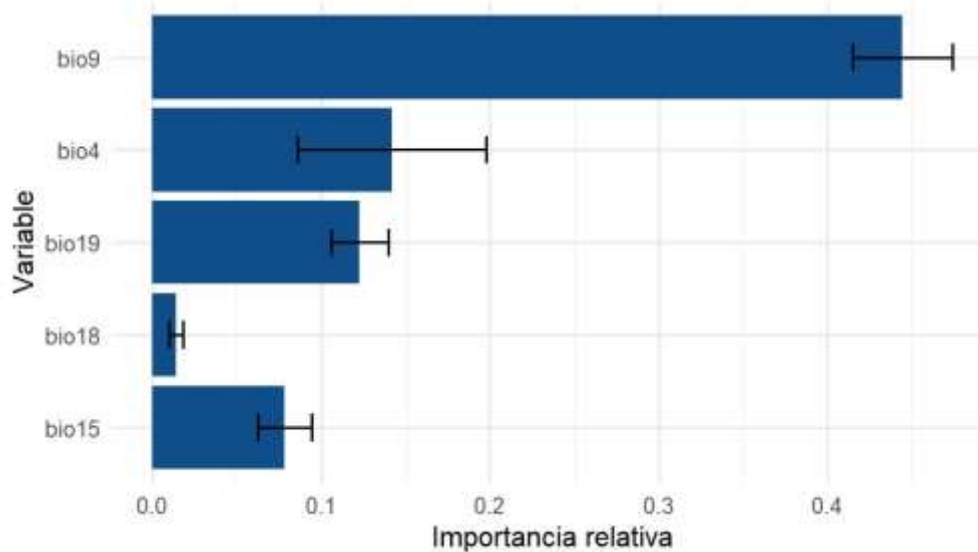
853

854 **Tabla 5.** Evaluación de los cuatro métodos implementados en el paquete *sdm*. AUC: área bajo la curva.
 855 TSS: *True skill statistic*. BRT: *Boosted regression tree*. GLM: *Generalized linear models*. Maxent:
 856 *Maximum entropy*. RF: *Random Forest*.

Método	AUC	TSS
BRT	0.87	0.86
GLM	0.87	0.87
MAXENT	0.98	0.98
RF	0.79	0.79

857

858



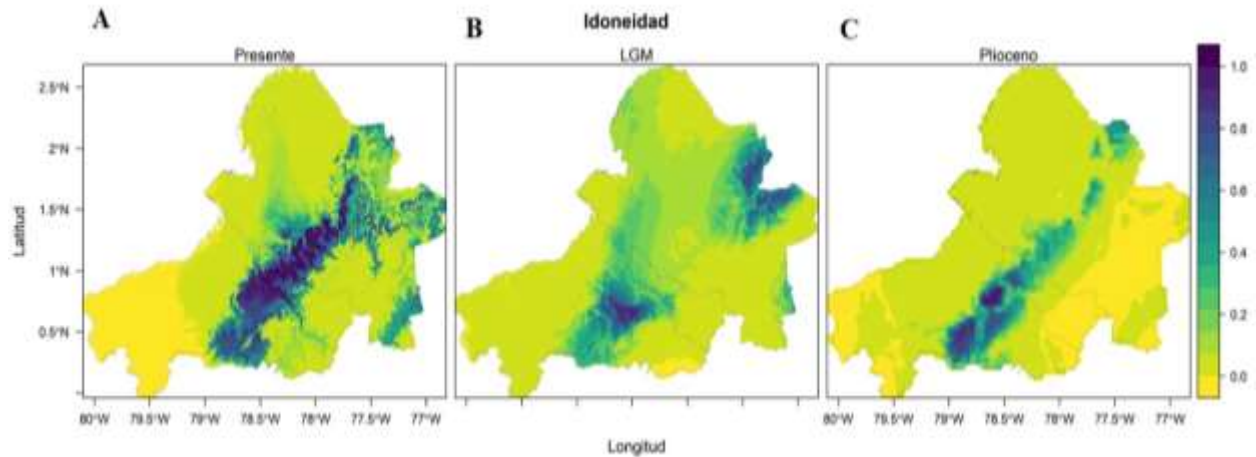
859

860

861

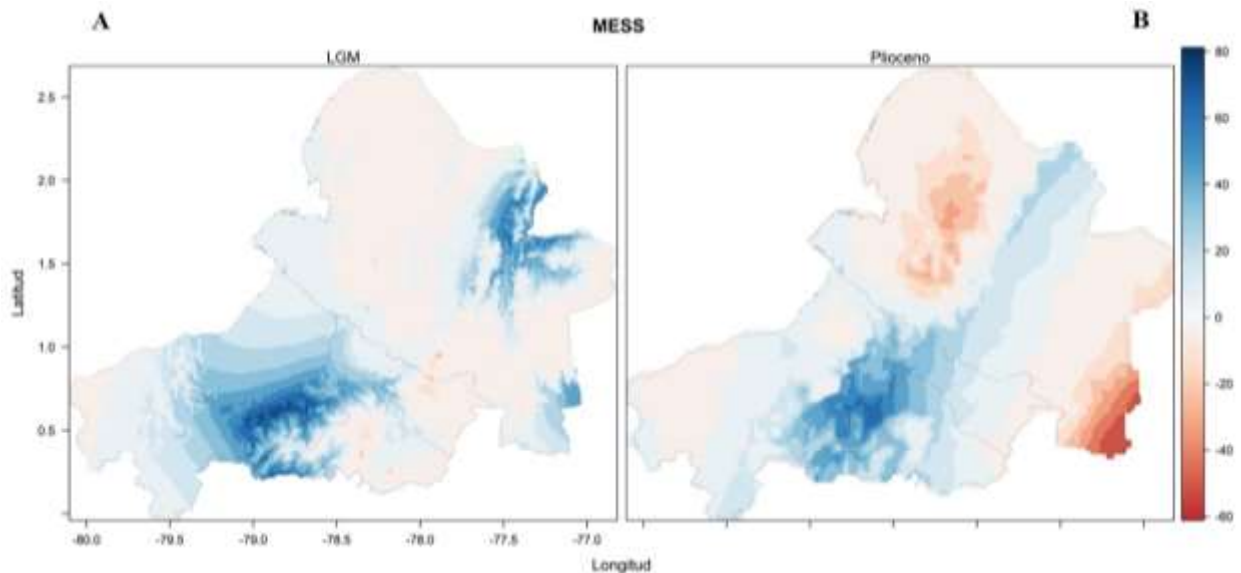
862

Figura 5. Variables climáticas de mayor importancia para el desempeño del modelo (Ver tabla 4 para abreviaturas)



863
864
865
866

Figura 6. (A) Distribución potencial para *Rhaebo colomai*. Reconstrucciones paleoclimáticas durante el (B) LGM (21 000 años) y (C) Plioceno (3.3 M.a.)



867
868
869
870
871
872
873

Figura 7. MESS para *Rhaebo colomai* durante (A) LGM (21 000 años) y (B) Plioceno (3.3 M.a.). Las áreas azules (valores MESS positivos) corresponden a áreas proyectadas con condiciones climáticas similares al modelamiento del presente, mientras que las áreas de color rojo (valores MESS negativos) indican el grado de diferencia en el área de proyección con respecto a las condiciones climáticas del modelamiento del presente.

874 3.2. Estructuración genética y variabilidad poblacional de *Rhaebo colomai* en Colombia

875
876 El alineamiento del gen COI fue de 582 pares de bases (pb) a partir de 40 individuos de *R. colomai*.
877 En general, un total de 11 sitios polimórficos fueron identificados, de los cuales 10 se encontraron
878 en los haplotipos de la Q2 (Tabla 6). Debido a esto, los índices de diversidad haplotípica y

879 nucleotídica fueron mayores para la Q2 y más bajos para la Q1, con tres y dos haplotipos,
 880 respectivamente (Tabla 6). Por otro lado, la diversidad más baja fue hallada en la Q3 y en Bq.
 881 Específicamente, la Q3 a pesar de poseer un número semejante de muestras que la Q1 y la Q2,
 882 sólo presentó un único haplotipo (Tabla 6).

883

884 **Tabla 6.** Variabilidad genética del gen COI de *Rhaebo colomai* en la Reserva Natural Río Ñambí.
 885 N: número de individuos; S: número de sitios polimórficos; N_H: número de haplotipos; H: diversidad
 886 haplotípica; π : diversidad nucleotídica. SD: desviación estándar.

887

Localidad	N	S	(N _H)	H (SD)	π (SD)
Quebrada 1 (Q1)	11	1	2	0.182 (0.144)	0.00031 (0.00025)
Quebrada 2 (Q2)	10	10	3	0.689 (0.104)	0.00764 (0.00175)
Quebrada 3 (Q3)	12	0	1	-	-
Bosque (Bq)	7	0	1	-	-
Total	40	11	4	0.276 (0.090)	0.00238 (0.00098)

888

889 La red haplotípica para el gen COI mostró ausencia de agrupamientos entre los sitios analizados
 890 (Fig. 8). El Hap1 puede considerarse como ancestral, ya que fue el más frecuente (compartido por
 891 34 individuos, 85%) y se encontró en todos los sitios de muestreo (Fig. 8). A partir del Hap1
 892 divergen tres haplotipos únicos o exclusivos, siendo el Hap2 el más divergente por presentar ocho
 893 mutaciones, seguido del Hap3 con dos mutaciones de diferencia y el Hap4 con una sola mutación,
 894 con respecto al Hap1. Los haplotipos Hap2 y Hap3 fueron exclusivos para la Q2, mientras que el
 895 Hap4 fue exclusivo para la Q1.

896

897

898

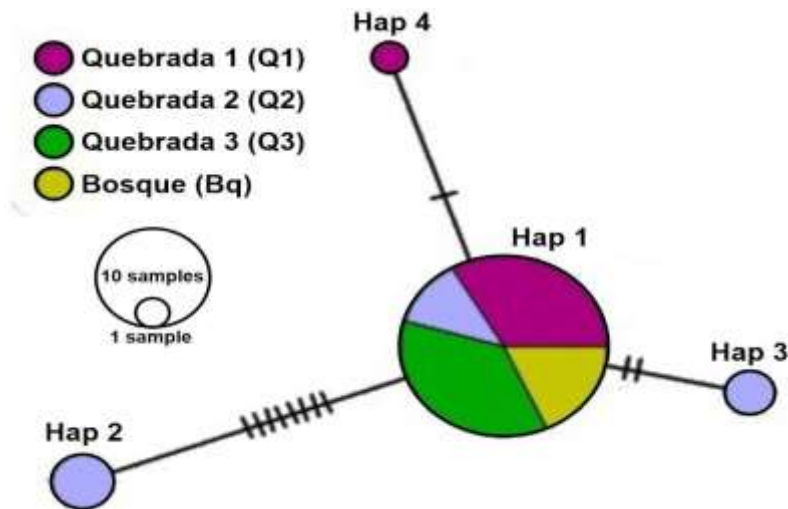
899

900

901

902

903



904
 905
 906 **Figura 8.** Red de haplotipos (Hap; círculos) para el gen COI de *Rhaebo colomai* en la Reserva
 907 Natural Río Ñambí (Colombia). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de estos.
 908 Cada color representa el sitio de muestreo evaluado y las líneas transversales representan los eventos
 909 mutacionales.
 910

911 Al evaluar todas las localidades como una única población panmíctica dentro de la RNRÑ, se
 912 encontró estructuración poblacional significativa (Φ_{ST} General: 0.201; $P < 0.05$). Sin embargo,
 913 cuando se analizaron los posibles escenarios de estructuración, no se detectó ningún escenario de
 914 diferenciación poblacional en los agrupamientos realizados ($\Phi_{CT} P > 0.05$; Tabla 7). Por otro lado,
 915 el índice Φ_{ST} par a par detectó diferenciación poblacional significativa entre Q1 y Q2 y entre Q2
 916 y Q3, mientras que el índice F_{ST} par a par únicamente detectó diferenciación significativa entre
 917 Q2 y Q3. Las demás estimaciones efectuadas entre los sitios muestreados no resultaron
 918 significativamente diferentes entre ellas (Tabla 8). De esa forma, los análisis sobre estructuración
 919 poblacional indican que los individuos de Q2 probablemente representan una población
 920 diferenciada de la población formada por los individuos de la Q1/Q3/Bq, el cual fue el escenario
 921 de agrupamiento con mayor Φ_{CT} en la AMOVA (Tabla 7).

927

928 **Tabla 7.** Análisis molecular de varianza (AMOVA) para *Rhaebo colomai*. %: porcentaje de
 929 variación; *P*: P-valor. Los sitios con color igual representan el mismo agrupamiento. Sigla de los
 930 sitios como en la Tabla 1.

931

Sitios de muestreo				Dentro de los grupos			Entre poblaciones dentro de grupos			Entre grupos		
				%	Φ_{ST}	<i>P</i>	%	Φ_{SC}	<i>P</i>	%	Φ_{CT}	<i>P</i>
Q1	Q2	Q3	Bq	80.65	0.193	0.006	22.08	0.214	0.006	-2.73	-0.020	0.670
Q1	Q2	Q3	Bq	91.39	0.086	0.003	32.09	0.259	0.000	-23.49	-0.234	1.000
Q1	Q2	Q3	Bq	87.15	0.128	0.005	32.40	0.270	0.013	-19.55	-0.195	0.505
Q1	Q2	Q3	Bq	77.98	0.220	0.004	14.85	0.159	0.105	7.17	0.070	0.343
Q1	Q2	Q3	Bq	76.27	0.237	0.003	-8.63	-0.127	1.000	32.36	0.323	0.335
Q1	Q2	Q3	Bq	85.36	0.146	0.001	51.25	0.375	0.014	-36.61	-0.366	0.827
Q1	Q2	Q3	Bq	62.84	0.370	0.005	-6.12	-0.100	0.590	43.27	0.432	0.247
Q1	Q2	Q3	Bq	74.30	0.256	0.001	-5.94	-0.086	0.484	31.64	0.316	0.159

932

933 **Tabla 8.** Valores de Φ_{ST} y F_{ST} par a par del gen COI para *Rhaebo colomai*. Arriba de la diagonal los
 934 valores Φ_{ST} y debajo de la diagonal los valores F_{ST} . Entre paréntesis se muestran los *P*-valores. El *
 935 indica los *P*-valor estadísticamente significativos después de la corrección FDR empleando un *P*-
 936 valor de 0.05. Sigla de los sitios como en la Tabla 1.

937

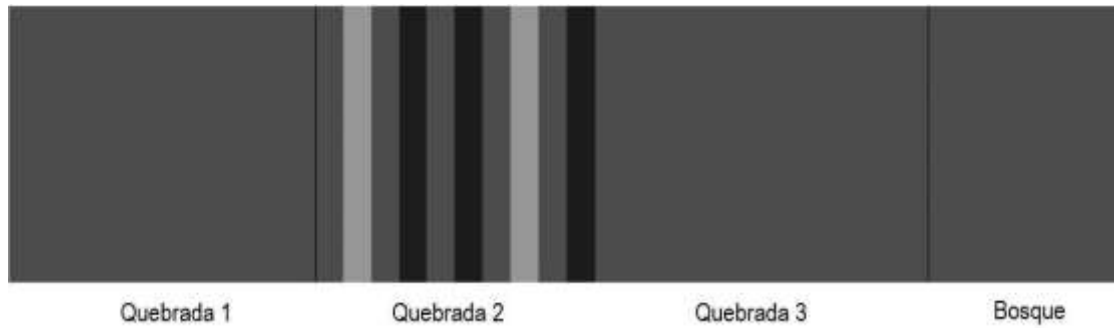
	Q1	Q2	Q3	Bq
Q1		0.214 (0.0153*)	0.008 (0.4815)	0 (0.9999)
Q2	0.211 (0.0214)		0.236 (0.0095*)	0.152 (0.1337)
Q3	0.008 (0.4769)	0.343 (0.0071*)		0 (0.9999)
Bq	0 (0.9999)	0.253 (0.0647)	0 (0.9999)	

938

939 El análisis bayesiano implementado en BAPS mostró heterogeneidad genética entre los sitios de
 940 muestreo evaluados. El logaritmo de la probabilidad marginal para K=2 fue de -58.1874 mientras
 941 que para K=3 fue de -53.7076, indicando que el número de grupos más probable es tres (Fig. 9).
 942 El primer grupo está formado por los individuos que presentan el Hap1 y Hap4 de todas las
 943 quebradas y el bosque, mientras que los otros dos grupos se restringen a individuos de la quebrada
 944 dos que presentan el Hap2 o el Hap3.

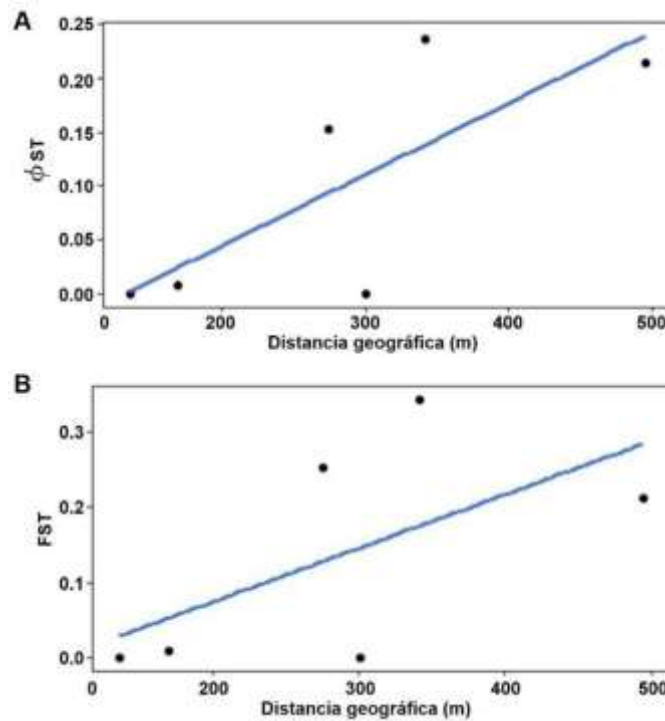
945

946



947
 948
 949 **Figura 9.** Análisis bayesiano implementado en BAPS mostrando heterogeneidad genética entre los
 950 sitios de muestreo para *Rhaebo colomai*. Cada color representa una población genéticamente
 951 distinguible. El color gris claro son individuos que tiene el haplotipo Hap3, el color negro aquellos
 952 con el haplotipo Hap2 y el color gris oscuro son individuos con los haplotipos Hap1 y Hap4.
 953

954 Finalmente, la prueba de Mantel no mostró una relación significativa entre las distancias genéticas
 955 y las distancias geográficas (Φ_{ST} : $r = 0.69$; $P = 0.12$, Fig. 10A; F_{ST} : $r = 0.52$; $P = 0.25$, Fig. 10B)
 956 de los sitios de muestreo evaluados para el gen COI.



957
 958
 959 **Figura 10.** Prueba de aislamiento por distancia con test de Mantel. Distancia genética de Φ_{ST} vs las
 960 distancias geográficas de los sitios de muestreo (A). Distancia genética de F_{ST} vs las distancias
 961 geográficas de los sitios de muestreo (B).
 962

963

4. DISCUSIÓN

4.1. Historia evolutiva

La divergencia de *Rhaebo colomai* de *R. olallai* en el área ancestral del Sur de la cordillera Norte de los Andes (SAN) durante el Plioceno (hace ~3.1 M. a.; Fig. 3) es similar a lo ocurrido en otras especies de bufónidos sudamericanos que también divergieron entre el Plioceno y el Pleistoceno (e.g. Maciel *et al.*, 2010; Thomé *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2022). Durante el Plioceno tardío (hace 5–3 M.a.) ocurrió la expansión de los bosques montanos neotropicales (Jaramillo, 2019), al parecer facilitado por eventos climáticos globales caracterizados por temperaturas más cálidas y estables (Liu & Leopold, 1994; Kong, 1996; Ravelo *et al.*, 2006; Filippelli & Flores, 2009). Tales condiciones potencialmente influyeron en la diversificación de los anfibios en las montañas del mundo, debido a que la estabilidad climática y las extensiones de las áreas de vida condujeron a un aumento de la tasa de especiación (García-Rodríguez *et al.*, 2021). Además, la intensificación del levantamiento del Norte de los Andes durante el Plioceno condujo a un aumento de la complejidad topográfica y facilitó los procesos de especiación (Hoorn *et al.*, 2010; Jaramillo, 2019).

Los cambios geomorfológicos durante el Plioceno y la persistencia de las condiciones climáticas durante largos periodos de tiempo parecen haber favorecido la divergencia de diferentes bufónidos no solo en Sudamérica (e.g. Maciel *et al.*, 2010), sino también en otras regiones del mundo (e.g. Fong *et al.*, 2016, 2020; Fukutani *et al.*, 2020). Particularmente, el modelamiento histórico del Plioceno hecho para *R. colomai* apoya lo antes mencionado, ya que la adecuabilidad del área del noroccidente del Ecuador (Fig. 6C) y las condiciones de estabilidad climática (Fig. 7B) mediadas principalmente por la estacionalidad de la temperatura y la precipitación (Fig. 5), son los principales impulsores de la amplitud del nicho a nivel de especie para los anfibios (Quintero & Wiens, 2013). Además, ello probablemente representó un nicho climático adecuado para la divergencia y el establecimiento de la especie en el área ancestral del Sur de la cordillera Norte de los Andes (SAN) (Fig. 3 y 6C).

994 Las fluctuaciones climáticas y las glaciaciones durante el Pleistoceno (2.58 M.a. – 11 700 años)
995 han demostrado ser factores que influyeron en la demografía histórica de varias especies de
996 anfibios (Nuñez *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Paz *et al.*, 2019), además de haber sido críticas en
997 la configuración de las distribuciones y en los atributos genéticos de las especies (Hewitt, 2000,
998 2004; Avise, 2009). Durante este periodo, en la región tropical de América del Sur ocurrió un
999 dipolo de precipitación oriente-occidente, lo cual conllevó a que en la región de la Amazonía
1000 oriental los niveles de precipitación fueran bajos en el LGM, mientras que, en la Amazonía
1001 occidental, en los Andes tropicales y en el subtropical suroriental los niveles de precipitación fueron
1002 relativamente altos (Baker *et al.*, 2020). Estos patrones de precipitación, semejantes a las
1003 condiciones actuales (Baker *et al.*, 2020), junto con las áreas de endemismos definidas para
1004 diferentes grupos, han permitido inferir potenciales áreas de refugio de bosques húmedos durante
1005 el LGM en América del Sur (Rull, 2020).

1006
1007 Particularmente en los Andes tropicales, durante el período entre 45–25 mil años en el cual se
1008 presentó el máximo avance de los glaciares, los bosques montanos mantuvieron las condiciones
1009 húmedas (Hooghiemstra & van der Hammen, 2004). Dicha estabilidad climática de los refugios
1010 de bosques húmedos permitió que las especies surgieran y se mantuvieran en el tiempo (Graham
1011 *et al.*, 2006). En este sentido, el área predicha de adecuabilidad durante el LGM para *R. colomai*
1012 la cual abarca el noroccidente en Ecuador (Fig. 6B), probablemente representó un nicho climático
1013 adecuado, el cual se encontraba geográficamente aislado y cuya estabilidad ambiental (Fig. 7A) a
1014 lo largo del tiempo en el mismo espacio geográfico le permitió sobrevivir.

1015
1016 Lo anterior es consistente con previos estudios desarrollados con anfibios asociados a bosques
1017 húmedos de mediana y alta altitud en Colombia (Paz *et al.*, 2019) y en bosques montanos de
1018 Sudamérica (Carnaval *et al.*, 2009; Amaro *et al.*, 2012). En esos estudios se determinó que los
1019 ciclos glaciares tuvieron un impacto sobre la distribución histórica de las especies de anfibios
1020 asociados a esos ambientes, sugiriendo que ellas persistieron en refugios de bosques húmedos en
1021 épocas glaciares contrayendo sus rangos de distribución (e.g. Nuñez *et al.*, 2011; Paz *et al.*, 2019).
1022 A diferencia de las zonas templadas, donde las fluctuaciones climáticas estacionales y el clima
1023 histórico han provocado un aumento en las tasas de extinción de las especies (Kerckhoff *et al.*,
1024 2014), los trópicos con menor magnitud de las oscilaciones climáticas históricas sirvieron como

1025 refugios (Carnaval & Moritz, 2008), además de vincularlos con puntos calientes de endemismo
1026 (Carnaval *et al.*, 2009).

1027
1028 La expansión poblacional de *R. colomai* indicada por los análisis demográficos, inició
1029 aproximadamente hace 12 980 años después del LGM en el Ecuador y el LGM global (Fig. 4).
1030 Específicamente, en el área de los Andes Ecuatorianos antes de los 13 000 años durante el período
1031 Younger Dryas (~12 900 – 11 700 años) inicio la última etapa del LGM, caracterizada por el
1032 derretimiento de los glaciares (Heine, 1995ab, 2000) y un período de calentamiento en la región
1033 suramericana (Newnham & Lowe, 2000; Hajdas *et al.*, 2003; Carlson, 2013). Nuñez *et al.* (2011)
1034 y Nuñez *et al.* (2020) demostraron que las especies suramericanas de anuros como *y Eupsophus*
1035 *calcaratus* y *Batrachyla leptopus* respectivamente, experimentaron también expansión
1036 poblacional en las zonas afectadas por el LGM y que son coincidentes con el retiro de las masas
1037 glaciares. Después del retiro de los glaciares, otras especies de anfibios experimentaron
1038 expansiones durante períodos interglaciares cálidos y húmedos (Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*,
1039 2012).

1040

1041 **4.2. Estructuración genética y variabilidad poblacional de *Rhaebo colomai* en Colombia**

1042

1043 El uso de marcadores mitocondriales es muy útil para delimitar poblaciones (Moritz, 1994; Zink
1044 & Barrowclough, 2008) así como para mostrar señales de estructura filogeográfica a escalas finas
1045 (Vásquez *et al.*, 2013; Montoya-Marín, 2019). Uno de los atributos más importantes de una especie
1046 es la variabilidad genética, la cual puede verse influenciada por múltiples factores tales como la
1047 deriva genética y barreras al flujo génico (Freeland, 2005; Hamilton, 2009). Los valores
1048 observados en este trabajo de diversidad haplotípica ($H = 0.276$) y de diversidad nucleotídica (π
1049 $= 0.00238$) del gen COI en *R. colomai* son bajos en comparación con otras especies de bufónidos
1050 donde se han usado diferentes marcadores mitocondriales (e.g. *Bufo japonicus* Cytb: $H =$
1051 $0.98-0.99$, $\pi = 0.005-0.008$, *B. torrenticola* Cytb: $H = 0.97$, $\pi = 0.006$, Fukutani *et al.*, 2020;
1052 *Osornophryne percrassa* COI: $H = 0.655$, $\pi = 0.00272$, Montoya-Marín, 2019; *Rhinella arunco*
1053 Región Control: $H = 0.956-0.286$, $\pi = 0.0007-0.01$, Vásquez *et al.*, 2013; *R. ornata* Región Control
1054 $H = 0.658-0.945$, $\pi = 0.018-0.009$, Dixo *et al.*, 2009; *Sclerophrys regularis* COI: $H = 1.00-0.833$,
1055 $\pi = 0.711-0.230$, Deef, 2019).

1056 Considerando la deriva genética, los bajos niveles de diversidad (H y $\pi < 0.5\%$) observados pueden
1057 ser producto de un cuello de botella reciente o de un efecto fundador por uno o pocos haplotipos
1058 mitocondriales (Grant & Bowen, 1998). Los cuellos de botella conducen a una reducción de la
1059 variabilidad genética por la disminución drástica del tamaño efectivo de la población, que a su vez
1060 produce un aumento tanto de la endogamia como del impacto de la deriva genética (Nei *et al.*,
1061 1975; Freeland, 2005). El análisis del *Bayesian Skyline Plot* aquí realizado (Fig. 4) no detectó
1062 ninguna señal de reducción poblacional, lo cual es congruente con los valores negativos obtenidos
1063 de los estadísticos D de Tajima y F_s de Fu. Esos resultados, en conjunto, indicarían que la
1064 población no atravesó un cuello de botella (Tajima, 1989; Fu, 1997). No obstante, es importante
1065 anotar que probablemente la población no haya sufrido una reducción tan drástica en abundancia
1066 para producir una firma de cuello de botella (Peery *et al.*, 2012), o inclusive que la señal genética
1067 de la expansión demográfica detectada esté oscureciendo la señal de un cuello de botella reciente
1068 (Funk *et al.*, 2009; Hoban *et al.*, 2013).

1069
1070 Por otro lado, la colonización de una nueva área por pocos individuos fundadores que exhiben solo
1071 una parte del pool genético presente en la población fuente, resulta en un tamaño efectivo
1072 poblacional pequeño y bajos niveles de variabilidad genética en la población recién fundada
1073 (Hamilton, 2009). Este escenario podría ser probable, considerando que después de la divergencia
1074 de la especie, hace ~ 3.1 M.a. hubo un evento de dispersión y colonización de individuos desde el
1075 sur hacia el norte de los Andes del Norte (Fig. 3) posiblemente con el haplotipo 1 ancestral (Hap1).
1076 Por lo tanto, se esperaría encontrar en los individuos del Ecuador el Hap1 y mayor variabilidad
1077 genética con pocos haplotipos compartidos. Bajos niveles de variabilidad genética producto de
1078 efectos fundadores han sido reportados en *Epidalea calamita* (Beebe & Rowe, 2000),
1079 *Eleutherodactylus coqui* (Peacock *et al.*, 2009), *Rana latastei* (Garner *et al.*, 2004), y *Rhinella*
1080 *marina* (Estoup *et al.*, 2001; Estoup *et al.*, 2010).

1081
1082 Rasgos de la historia natural de una especie (e.g. capacidad de dispersión y comportamientos
1083 reproductivos) y la presencia de barreras a la dispersión a lo largo de su distribución pueden influir
1084 en el flujo génico y actuar como barreras al mismo (Freeland, 2005). Las barreras al flujo génico
1085 conllevan a que poblaciones que se encuentran aisladas o en parches, es decir en zonas de hábitats
1086 delimitadas por áreas no aptas para la supervivencia de la especie, presenten un mayor impacto de

1087 la deriva genética y, por lo tanto, exhiban niveles de variabilidad genética menores en comparación
1088 con poblaciones que reciben migrantes efectivos (Templeton *et al.*, 1990; Freeland, 2005; Mona
1089 *et al.*, 2014). En anfibios, características tales como la baja vagilidad y alta filopatría a sitios natales
1090 (Blaustein *et al.*, 1994), así como la baja tolerancia a cambios ambientales (Navas & Otani, 2007)
1091 y alto grado de conservadurismo de nicho (Wiens & Graham, 2005), tienen el potencial de
1092 restringir el flujo génico (Freeland, 2005) y exacerbar los efectos de la deriva genética en
1093 poblaciones aisladas en parches (Templeton *et al.*, 1990; Dixo *et al.*, 2009).

1094
1095 *Rhaebo colomai* es una especie asociada a las quebradas y pequeños arroyos (Hoogmoed, 1989;
1096 Ron *et al.*, 2015; Reyes-Puig *et al.*, 2019), así como sucede en otras especies del género (e.g. *R.*
1097 *caeruleostictus*, *R. ceratophrys*, *R. ecuadorensis*, *R. guttatus*, *R. haematiticus*, *R. olallai*)
1098 (Hoogmoed, 1989; Savage 2002; Duellman, 2005; Fenolio *et al.*, 2012; Mueses-Cisneros *et al.*,
1099 2012; Lynch *et al.*, 2014; Caicedo-Martínez *et al.*, 2021), donde potencialmente se reproduce (con
1100 base en registro de adultos y juveniles: Hoogmoed, 1989; Ron *et al.*, 2015; Reyes-Puig *et al.*, 2019,
1101 observ. pers.). Por lo anterior, es posible que los individuos de *R. colomai* en RNRÑ, inmersos en
1102 una matriz de bosque maduro que abarca 1500 ha, presenten flujo génico restringido con los
1103 individuos ecuatorianos generando así la baja variabilidad observada. Los sitios más al Norte de
1104 Ecuador donde se ha reportado la especie, Peñas Blancas y Chical, se encuentran a una distancia
1105 lineal de 35.8 y 40.8 km de RNRÑ, respectivamente. Dicha distancia es mayor a la reportada para
1106 otras especies de anfibios donde se ha detectado flujo génico restringido con diferentes marcadores
1107 mitocondriales. Por ejemplo, barreras al flujo han sido detectadas entre sitios separados
1108 linealmente por 0.2–4.8 km en *Eleutherodactylus ockendeni* con *Cytb* (Elmer *et al.*, 2007), por
1109 0.6–2.8 km en *Rana japonica* con la región control (Kobayashi *et al.*, 2013), por 0.6–17.1 km en
1110 *Rhinella ornata* con la región control (Dixo *et al.*, 2009), por 2.5–4.9 km en *Centrolene*
1111 *prosolepon* con ND1 (Robertson *et al.*, 2008) y por 18 km en *Pristimantis palmeri* con el 16S y
1112 el COI combinados (García-R *et al.*, 2012). Adicionalmente, para varias especies de anfibios
1113 tropicales, cuyas poblaciones se encuentran en regiones con topografías complejas, se ha
1114 encontrado que efectivamente existe menos flujo génico, lo que incrementa la diferenciación
1115 regional en áreas montañosas (Guarnizo & Cannatella, 2013; Rodríguez *et al.*, 2015). Pese a esto,
1116 y considerando el porcentaje de adecuabilidad del área que abarca el suroccidente de Nariño en
1117 Colombia y el noroccidente en Ecuador para el modelo de distribución potencial del presente (Fig.

1118 6A), pueden existir otros sitios donde *R. colomai* se encuentre, y aún no haya sido reportada, que
1119 faciliten la conectividad entre las dos regiones y contrarresten los efectos de la deriva genética.

1120
1121 A una escala espacial más fina, el análisis de AMOVA falló en detectar escenarios significativos
1122 de estructuración poblacional debido al bajo poder estadístico por el limitado número de
1123 localidades muestreadas. En la AMOVA, cuando se tiene un número pequeño de sitios
1124 muestreados (< 6), la cantidad de permutaciones posibles es muy baja y es imposible detectar la
1125 subdivisión significativa que se genera entre los sitios analizados (Fitzpatrick, 2009). No obstante,
1126 en esos casos, si el P valor obtenido para el escenario de estructuración que maximiza el Φ_{CT} es
1127 cercano al P valor mínimo esperado para el esquema de agrupación y, se obtienen diferencias
1128 significativas entre comparaciones par a par, dicho escenario de estructuración se puede interpretar
1129 como el más probable (Fitzpatrick, 2009). Por lo tanto, considerando los resultados del Φ_{ST} y F_{ST}
1130 par a par (Tabla 8) y que el P valor obtenido para el escenario de estructuración que maximiza el
1131 Φ_{CT} ($P = 0.247$; Tabla 7) es muy cercano al P valor mínimo esperado para el esquema de
1132 agrupación ($P = 0.250$; Fitzpatrick, 2009), probablemente existe flujo génico restringido entre Q2 y
1133 la población formada por los individuos de Q1/Q3/Bq. Esto podría deberse a que la quebrada Q2
1134 se encuentra más aislada de los demás sitios de muestreo, con una distancia lineal promedio de
1135 370.7 m, y donde existe una franja de bosque amplia (2.9 ha) con una pendiente un poco
1136 pronunciada (Fig. 2A) que podría limitar el movimiento de los individuos entre Q2 y Q1/Q3/Bq.
1137 De hecho, un estudio sobre ecología poblacional realizado en RNRÑ demostró que los individuos
1138 de Q2 se mueven únicamente en esa quebrada, en un rango muy bajo entre 7–20 m a lo largo de
1139 la misma, y que entre Q1/Q3/Bq la pequeña área boscosa (0.3 ha) no ejerce resistencia al
1140 movimiento de individuos al registrarse el desplazamiento de un individuo entre Bq y Q1 después
1141 de 14 meses (Rojas-Rivera *et al.*, *en prep*).

1142
1143 Lo anterior concuerda con los resultados de la prueba de Mantel, ya que la ausencia de aislamiento
1144 significativo por distancia puede relacionarse con la presencia de una barrera física que limita el
1145 flujo génico (Hutchison & Templeton, 1999; Ramos *et al.*, 2018). En este caso, aunque se observa
1146 una relación positiva entre las distancias genéticas y geográficas, el patrón no es uniforme para
1147 todos los valores de distancias geográficas y solo se observan valores altos de Φ_{ST}/F_{ST} en las
1148 comparaciones relacionadas con Q2 (Fig. 10), indicando que la extensión y pendiente del bosque

1149 entre Q2 y Q1/Q3/Bq representa probablemente la barrera que restringe el flujo génico. No
1150 obstante, es importante resaltar que la no significancia de la prueba de Mantel puede estar
1151 relacionada posiblemente con el bajo número de sitios analizados (Ramos *et al.*, 2018; Rosche *et*
1152 *al.*, 2018; Arroyo-Lambaer *et al.*, 2018) o inclusive con el tipo de distancia geográfica empleada
1153 (Allentoft *et al.*, 2009; Wang, 2009). Por ejemplo, en *Anaxyrus exsul*, especie con rango de
1154 distribución restringido y alta especificidad de hábitat, se encontró que la correlación entre la
1155 distancia genética (F_{ST}) y la distancia geográfica sólo es significativa cuando esta última fue
1156 calculada considerando características del paisaje que pueden influir en la distancia efectiva que
1157 un organismo debe recorrer para moverse entre dos sitios como topografía y barreras físicas
1158 (Wang, 2009). Estudios realizados en bufónidos y en otras familias de anfibios, han revelado un
1159 patrón de estructuración genética a fina escala atribuido parcialmente a variables físicas como
1160 densidad y tamaño de áreas boscosas (e.g. Murphy *et al.*, 2010; Angelone *et al.*, 2011; Rhoads *et*
1161 *al.*, 2017) y a la distancia geográfica considerando la topografía (e.g. elevación, pendiente) y/o las
1162 barreras físicas (e.g. Rowe *et al.*, 2000; Wang, 2009; Murphy *et al.*, 2010; Wang, 2012; Wang,
1163 2013; Mims *et al.*, 2015; Sandberger-Loua *et al.*, 2018).

1164
1165 Los resultados presentados aquí sobre estructura genética de *R. colomai* fueron obtenidos
1166 considerando únicamente individuos de RNRÑ en Colombia. Por lo tanto, estudios futuros deberán
1167 incluir datos genéticos de individuos de Ecuador, por ejemplo de las localidades registradas por
1168 Reyes-Puig *et al.* (2019), que permitan evaluar las siguientes hipótesis: i) la región sur de los Andes
1169 del Norte, al representar el área ancestral de *R. colomai*, presentará mayor diversidad genética en
1170 comparación con la RNRÑ en Colombia; y ii) al ser una especie de montaña y, considerando los
1171 altos niveles de heterogeneidad del paisaje y las distancias topográficas, existirá flujo génico
1172 restringido entre los individuos de *R. colomai* de Colombia y Ecuador. Además, es necesario
1173 investigar con mayor detalle algunos aspectos ecológicos relacionados con la capacidad de
1174 dispersión y la fidelidad a las quebradas de *R. colomai*, e incluir análisis con marcadores nucleares
1175 polimórficos (e.g. microsatélites o SNPs) que permitan identificar las características del paisaje
1176 que afectan el flujo génico y poder explicar así con mayor certeza los patrones filogeográficos
1177 mencionados en este estudio.

1178

1179

1180 4.3. Implicaciones para la conservación

1181
1182 La evaluación de la variabilidad genética es una herramienta esencial en procesos de conservación,
1183 ya que además de reflejar los procesos demográficos evalúa el potencial de adaptación de las
1184 poblaciones y su persistencia a largo plazo (Smith *et al.*, 2014). En particular, la variabilidad puede
1185 verse afectada en poblaciones pequeñas debido a los efectos de la deriva y la endogamia (Beebee,
1186 2005). Por lo anterior, los objetivos de conservación que se deben plantear en la RNRÑ para *R.*
1187 *colomai* deben asegurar su supervivencia además de mantener la variabilidad genética. Por lo
1188 tanto, es importante sugerir que dentro del plan de manejo que existe de la RNRÑ se incluya a *R.*
1189 *colomai* como una especie objeto de conservación, lo cual permitirá implementar un programa de
1190 monitoreo (Bacca & Flórez, 2019). De esta forma, se facilitarán procesos de articulación con
1191 investigadores quienes podrán avanzar en obtener más información genética y ecológica de la
1192 especie.

1193
1194 Por último, es importante anotar que la rápida extinción de muchas especies de anfibios ha recibido
1195 gran atención en los últimos años. Los estudios que se enfocan en estos aspectos atribuyen como
1196 una de las principales causas de extinción el deterioro del clima global (Alford *et al.*, 2010;
1197 Vasconcelos-Tiago *et al.* 2018; Velasco *et al.*, 2021). Debido a la baja variabilidad genética, las
1198 poblaciones de *R. colomai* podrían ser propensas a la reducción del *fitness* si en algún momento
1199 su entorno cambia drásticamente, así como se ha observado en varias especies de anfibios (Alford
1200 *et al.*, 2001; Allentoft & O'Brien, 2010; Zhao *et al.*, 2022). Por ello, futuras investigaciones
1201 deberían incluir un monitoreo constante de la especie, en el que se incluyan parámetros climáticos,
1202 los cuales permitirían identificar a largo plazo cómo las variaciones ambientales afectarían el
1203 estado poblacional de la especie y los patrones genéticos.

1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1211
1212
- 1213 **Alford RA, Dixon PM, Pechmann JHK. 2001.** Global amphibian population declines. *Nature*
1214 **412:** 499–500.
- 1215 **Alvarado-Serrano DF, Knowles LL. 2013.** Ecological niche models in phylogeographic studies:
1216 applications, advances and precautions. *Molecular Ecology Resources* **14:** 233–248.
- 1217 **Allentoft ME, Siegismund HR, Briggs L, Andersen LW. 2009.** Microsatellite analysis of the
1218 natterjack toad (*Bufo calamita*) in Denmark: populations are islands in a fragmented landscape.
1219 *Conservation Genetics* **10:** 15–28.
- 1220 **Allentoft ME, O’Brien J. 2010.** Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness:
1221 a review. *Diversity* **2:** 47–71.
- 1222 **Allouche O, Tsoar A, Kadmon R. 2006.** Assessing the accuracy of species distribution models:
1223 Prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). *Journal of Applied Ecology* **43:** 1223–1232.
- 1224 **Angelone S, Kienast F, Holderegger R. 2011.** Where movement happens: scale-dependent
1225 landscape effects on genetic differentiation in the European tree frog. *Ecography* **34:** 714–722.
- 1226 **Amaro RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Carnaval AC. 2012.** Demographic
1227 processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the
1228 endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62:** 880–888.
- 1229 **Arroyo-Lambaer D, Chapman H, Hale M, Blackburn D. 2018.** Conservation genetics of two
1230 threatened frogs from the Mambilla highlands, Nigeria. *Plos one* **13:** e0202010.
- 1231 **Avise JC. 2009.** Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36:** 3–15.
- 1232 **Arteaga A, Pyron RA, Peñafiel N, Romero-Barreto P, Culebras J, Bustamante L, Yáñez-**
1233 **Muñoz M, Guayasamin JM. 2016.** Comparative phylogeography reveals cryptic diversity and
1234 repeated patterns of cladogenesis for amphibians and reptiles in Northwestern Ecuador. *PloS*
1235 *one* **11:** e0151746.
- 1236 **Báez AM, Gasparini ZB. 1979.** The South American herpetofauna: an evaluation of the fossil
1237 record. In: Duellman WE, ed. *The South American herpetofauna: its origin, evolution and*
1238 *dispersal*. Lawrence, Kansas, USA: Museum of Natural History, University of Kansas
1239 Monograph No.7: 29–55.

1240 **Bacca N, Flórez C. 2019.** Construcción participativa del plan de manejo de la reserva natural río
1241 ñambí-colombia. Fundación Ecológica Los Colibríes de Altaquer FELCA, Critical Ecosystem
1242 Partnership Fund CEPF.

1243 **Baker PA, Fritz SC, Battisti DS, Dick CW, Vargas OM, Asner GP, Martin RE, Wheatley A,**
1244 **Prates I. 2020.** Beyond Refugia: New insights on Quaternary climate variation and the
1245 evolution of biotic diversity in tropical South America. In: Rull V, Carnaval A, eds. *Neotropical*
1246 *diversification: Patterns and processes*. Fascinating Life Sciences. Springer, Cham.

1247 **Bandeira LN, Villalobos F, Werneck FP, Peterson AT, Anciães M. 2021.** Different elevational
1248 environments dictate contrasting patterns of niche evolution in Neotropical *Pithecopus* treefrog
1249 species. *Biotropica* **53**: 1042–1051.

1250 **Beebee TJC. 2005.** Conservation genetics of amphibians. *Heredity* **95**: 423–427.

1251 **Beebee TJC, Rowe G. 2000.** Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti
1252 populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biological Journal of the*
1253 *Linnean Society* **69**: 367–381.

1254 **Benjamini Y, Hochberg Y. 1995.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful
1255 approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**: 289–300.

1256 **Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP. 1994.** Amphibians declines: judging stability, persistence,
1257 and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* **8**: 60–
1258 71.

1259 **Burrowes PA, Joglar RL. 1999.** Population genetics of the Puerto Rican cave-dwelling frog,
1260 *Eleutherodactylus cooki*. *Journal Herpetology* **33**: 706–711.

1261 **Breiman L. 2001.** Random forests. *Mach Learn* **45**: 5–32.

1262 **Broennimann O, Mráz P, Petitpierre B, Guisan A, Müller-Schärer H. 2014.** Contrasting
1263 spatio-temporal climatic niche dynamics during the eastern and western invasions of spotted
1264 knapweed in North America. *Journal of Biogeography* **41**: 1126–1136.

1265 **Brown JL, Hill DJ, Dolan AM, Carnaval AC, Haywood AM. 2018.** PaleoClim, high spatial
1266 resolution paleoclimate surfaces for global land areas. *Scientific Data* **5**: 1–9.

1267 **Cabe PR, Page RB, Hanlon TJ, Aldrich ME, Connors L, Marsh DM. 2007.** Fine-scale
1268 population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander *Plethodon cinereus* living
1269 in continuous habitat. *Heredity* **98**: 53–60.

1270 **Caicedo-Martínez LS, Castaño-Bernal N, Ramírez-Castaño VA. 2021.** *Rhaebo haematiticus*
1271 (Cope, 1862). Sapo de Truando, sapo hojarasquero. *Catálogo de Anfibios y Reptiles de*
1272 *Colombia* **7**: 81–89.

1273 **Carnaval AC, Moritz C. 2008.** Historical climate modelling predicts patterns of current
1274 biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* **35**: 1187–1201.

1275 **Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C. 2009.** Stability predicts
1276 genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* **323**: 785–789.

1277 **Carlson AE. 2013.** The Younger Dryas Climate Event. In: Elias SA, ed. *The Encyclopedia of*
1278 *Quaternary Science*, vol. 3, pp. 126-134. Amsterdam: Elsevier.

1279 **Chen SY, Zhang YJ, Wang XL, Sun JY, Xue Y, Zhang P, Zhou H, Qu L-H. 2012.** Extremely
1280 low genetic diversity indicating the endangered status of *Ranodon sibiricus* (Amphibia:
1281 Caudata) and implications for phylogeography. *Plos one* **7**: e33378.

1282 **Clark W, Christopher K. 2001.** Chapter 5. An Introduction to DNA: Spectrophotometry,
1283 Degradation, and the ‘Frankengel’ Experiment. *Tested studies for laboratory teaching* **22**: 81–
1284 99. In: Karcher SJ, ed. *Tested studies for laboratory teaching. Proceedings of the 22nd*
1285 *Workshop/Conference of the Association of Biology Laboratory Education (ABLE)*, 489pp.

1286 **Coloma LA, Ron SR, Frenkel C, Pazmiño-Armijos G, Carrión JC. 2020.** *Rhaebo*
1287 *haematiticus*. In: Ron SR, Merino-Viteri A, Ortiz DA, Eds. 2019. *Anfibios del Ecuador*. Museo
1288 de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

1289 **Corander J, Cheng L, Marttinen P, Sirén J, Tang J. 2013.** *BAPS: Bayesian analysis of*
1290 *population structure*. Finland: Department of Mathematics and Statistics, University of
1291 Helsinki.

1292 **Cortés-Bedoya S. 2019.** Dinámica poblacional de *Rhaebo colomai* (Hoogmoed 1985, Amphibia:
1293 Bufonidae): amenazas y estrategias para su conservación en el suroccidente de Nariño,
1294 Colombia. Unpublished Tesis de Maestría. Universidad de Manizales. Manizales, Colombia.

1295 **de Carvalho TR, Moraes LJCL, Lima AP, Fouquet A, Peloso PLV, Pavan D, Drummond**
1296 **LO, Rodrigues MT, Giaretta AA, Gordo M, Neckel-Oliveira S, Haddad CFB. 2021.**
1297 Systematics and historical biogeography of neotropical foam-nesting frogs of the *Adenomera*
1298 *heyeri* clade (Leptodactylidae), with the description of six new Amazonian species. *Zoological*
1299 *Journal of the Linnean Society* **191**: 395–433.

- 1300 **Dixo M, Metzger JP, Morgante JS, Zamudio KR. 2009.** Habitat fragmentation reduces genetic
1301 diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic coastal forest.
1302 *Biological Conservation* **142**: 1560–1569.
- 1303 **Dodd CK, Jr. 2009.** *Amphibian ecology and conservation. A handbook of techniques.* Oxford,
1304 UK: Oxford University Press, 556.
- 1305 **Dolan AM, Haywood AM, Hunter SJ, Tindall JC, Dowsett HJ, Hill DJ, Pickering SJ. 2015.**
1306 Modelling the enigmatic late Pliocene glacial event—Marine Isotope Stage M2. *Global and*
1307 *Planetary Change* **128**: 47–60.
- 1308 **Donnelly MA, Guyer CJ, Juterbock E, Alford RA. 1994.** Techniques for marking amphibians.
1309 In: Heyer WR, Donnelly MA, McDiarmid RW, Hayek, L-AC, Foster MS, eds. *Measuring and*
1310 *monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians.* Washington, D.C.:
1311 Smithsonian Institution Press, 277–284.
- 1312 **Duellman WE. 1999.** Distribution patterns of amphibians in South America. In: Duellman WE,
1313 ed. *Patterns of distribution of amphibians: a global perspective.* Baltimore: The Johns Hopkins
1314 University Press, 255–328.
- 1315 **Duellman WE, Trueb L. 1994.** *Biology of amphibians.* Baltimore: The Johns Hopkins University
1316 Press.
- 1317 **Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.
1318 *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214.
- 1319 **Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
1320 throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- 1321 **Elmer KR, Dávila JA, Lougheed SC. 2007.** Cryptic diversity and deep divergence in an upper
1322 Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC evolutionary biology* **7**: 1–14.
- 1323 **Elith J, Kearney M, Phillips S. 2010.** The art of modelling range-shifting species. *Methods in*
1324 *ecology and evolution* **1**: 330–342.
- 1325 **Estoup A, Wilson IJ, Sullivan C, Cornuet JM, Moritz C. 2001.** Inferring population history
1326 from microsatellite and enzyme data in serially introduced cane toads, *Bufo marinus*. *Genetics*
1327 **159**: 1671–1687.
- 1328 **Estoup A, Baird SJ, Ray N, Currat M, Cornuer JM, Santos, Beaumont MA, Excoffier, L.**
1329 **2010.** Combining genetic, historical, and geographical data to reconstruct the dynamics of

1330 bioinvasions: application to the cane toad *Bufo marinus*. *Molecular ecology resources* **10**: 86–
1331 901.

1332 **Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric
1333 distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.
1334 *Genetics* **131**: 479–491.

1335 **Excoffier L, Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform
1336 population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**:
1337 564–567.

1338 **Fenolio DB, Mendelson JR, III, Lamar WW. 2012.** A new diagnosis and description of variation
1339 among adult *Rhinella ceratophrys* (Boulenger) (Amphibia: Bufonidae), with notes on ecology
1340 and distribution. *South American Journal of Herpetology* **7**: 9–15.

1341 **Filippelli GM, Flores JA. 2009.** From the warm Pliocene to the cold Pleistocene: A tale of two
1342 oceans. *Geology* **37**: 959–960.

1343 **Fitzpatrick BM. 2009.** Power and sample size for nested analysis of molecular variance.
1344 *Molecular Ecology*, **18**: 3961–3966.

1345 **Fong JJ, Li PP, Yang BT, Zhou ZY, Leaché AD, Min MS, Waldman B. 2016.** Influence of
1346 geology and human activity on the genetic structure and demography of the Oriental fire-bellied
1347 toad (*Bombina orientalis*). *Molecular phylogenetics and Evolution* **97**: 69–75.

1348 **Fong JJ, Yang BT, Li PP, Waldman B, Min MS. 2020.** Phylogenetic systematics of the water
1349 toad (*Bufo stejnegeri*) elucidates the evolution of semi-aquatic toad ecology and Pleistocene
1350 Glacial Refugia. *Frontiers Ecology Evolution* **7**: 523.

1351 **Fu YX. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking
1352 and background selection. *Genetics* **147**: 915–925.

1353 **Fukutani K, Matsui M, Van Tran D, Nishikawa K. 2022.** Genetic diversity and demography of
1354 *Bufo japonicus* and *Bufo torrenticola* (Amphibia: Anura: Bufonidae) influenced by the
1355 Quaternary climate. *PeerJ* **10**: e13452.

1356 **Funk W.C, Forsman, E.D, Johnson M, Mullins T.D, Haig S. M. 2010.** Evidence for recent
1357 population bottlenecks in northern spotted owls (*Strix occidentalis caurina*). *Conservation*
1358 *Genetics* **11**:1023–1021.

1359 **Friedman JH. 2001.** Greedy function approximation: a gradient boosting machine. *Annals of*
1360 *Statistics* **29**: 1189–1232.

- 1361 **Freeland JR. 2005.** *Molecular Ecology*. Wiley, South Sussex.
- 1362 **Frost DR. 2021.** *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 6.1 (sep 2021).
1363 Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. New
1364 York, USA: American Museum of Natural History.
- 1365 **García-R JC, Crawford AJ, Mendoza AM, Ospina O, Cárdenas H, Castro F. 2012.**
1366 Comparative phylogeography of direct-developing frogs (Anura: Craugastoridae: *Pristimantis*)
1367 in the southern Andes of Colombia. *Plos one* **7**: e46077.
- 1368 **García-Rodríguez A, Velasco JA, Villalobos F, Parra-Olea G. 2021.** Effects of evolutionary
1369 time, speciation rates and local abiotic conditions on the origin and maintenance of amphibian
1370 montane diversity. *Global Ecology and Biogeography*: **30**: 674–684.
- 1371 **Garner TWJ, Pearman PB, Angelone S. 2004.** Genetic diversity across a vertebrate species'
1372 range: a test of the central-peripheral hypothesis. *Molecular Ecology* **13**: 1047–1053.
- 1373 **Gómez LF, Gallego B, Naranjo LG. 2017.** Atlas socioambiental de las cuencas transfronterizas
1374 Mira y Mataje: aportes para su ordenamiento y gestión integral Colombia- Ecuador. Cali:
1375 WWF-Colombia.
- 1376 **Graham CH, Moritz C, Williams SE. 2006.** Habitat history improves prediction of biodiversity
1377 in rainforest fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 632–636.
- 1378 **Grant WS, Bowen BW. 1998.** Shallow population histories in deep evolutionary lineages of
1379 marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal*
1380 *Heredity* **89**: 415–425.
- 1381 **Guarnizo CE, Cannatella DC. 2013.** Genetic divergence within frog species is greater in
1382 topographically more complex regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary*
1383 *Research* **51**: 333–340.
- 1384 **Gutiérrez A, Carillo E, Rojas SV. 2004.** *Guía ilustrada de los colibríes de la Reserva Natural*
1385 *Río Nambí*. Bogotá: FPAA, Felca, Ecotono.
- 1386 **Hajdas I, Bonani G, Moreno PI, Ariztegui D. 2003.** Precise radiocarbon dating of late-glacial
1387 cooling in mid-latitude South America. *Quaternary Research* **59**: 70–78.
- 1388 **Hamilton M.B. 2009.** *Population Genetics*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- 1389 **Haffer J. 1969.** Speciation in amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.
- 1390 **Haffer J. 1982.** General aspects of the refuge theory. In: Prance GT, ed. *Biological diversification*
1391 *in the tropics*: 6–24. Columbia University Press.

- 1392 **Hanley JA, McNeil BJ. 1982.** The meaning and use of the area under a receiver operating
1393 characteristic (ROC) curve. *Radiology* **143**: 29–36.
- 1394 **Heine K. 1995a.** Late Quaternary glacier advances in the Ecuadorian Andes: a preliminary report.
1395 *Quaternary of South America and Antarctic* **9**: 1–22.
- 1396 **Heine K. 1995b.** Bedded slope deposits with respect to the late Quaternary glacial sequence in the
1397 high Andes of Ecuador and Bolivia. In: Slaymaker, O, Ed. *Steepland Geomorphology*. J. Wiley
1398 & Sons, Chichester, pp. 257–278.
- 1399 **Heine K. 2000.** Tropical South America during the last glacial maximum: evidence from glacial,
1400 periglacial and fluvial records. *Quaternary International* **72**: 7–21.
- 1401 **Heled J, Drummond AJ. 2012.** Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence
1402 time estimation. *Systematic Biology* **6**: 138–149.
- 1403 **Hewitt GM. 1996.** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and
1404 speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247–276.
- 1405 **Hewitt GM. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907–913.
- 1406 **Hewitt GM. 2004.** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical
1407 Transactions of the Royal Society of London B* **359**: 183–195.
- 1408 **Hijmans, R. J., Phillips, S., Leathwick, J., & Elith, J. 2017.** dismo: Species distribution
1409 modeling. *R package version 1.4.2*.
- 1410 **Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JE, Jones PG, Jarvis A. 2005.** Very high-resolution
1411 interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**:
1412 1965–1978.
- 1413 **Hoban SM, Gaggiotti OE, Bertorelle G. 2013.** The number of markers and samples needed for
1414 detecting bottlenecks under realistic scenarios, with and without recovery: a simulation-based
1415 study. *Molecular Ecology* **22**: 3444–3450.
- 1416 **Holdridge LR. 1967.** Life Zone Ecology. Tropical Science Center, San Jose. 206 pp.
- 1417 **Hooghiemstra H, van der Hammen T. 2004.** Quaternary Ice-Age dynamics in the Colombian
1418 Andes: developing an understanding of our legacy. *Philosophical transactions of the Royal
1419 Society of London B* **359**: 173–180.
- 1420 **Hoogmoed MS. 1985.** A new genus of toads (Amphibia: Anura: Bufonidae) from the Pacific
1421 slopes of the Andes in northern Ecuador and southern Colombia, with the description of two
1422 new species. *Zoologische Mededelingen* **59**: 251–274.

- 1423 **Hoogmoed MS. 1989.** On the identity of some toads of the genus *Bufo* from Ecuador, with
1424 additional remarks on *Andinophryne colomai* Hoogmoed, 1985 (Amphibia: Anura, Bufonidae).
1425 *Zoologische Verhandlungen* **250**: 1–32.
- 1426 **Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I,**
1427 **Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP, Jaramillo C, Riff D, Negri FR,**
1428 **Hooghiemstra H, Lundberg J, Stadler T, Särkinen T, Antonelli A. 2010.** Amazonia through
1429 time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* **330**: 927–
1430 931.
- 1431 **Hutchison DW, Templeton AR. 1999.** Correlation of pairwise genetic and geographic distance
1432 measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic
1433 variability. *Evolution* **53**: 1898–1914.
- 1434 **Hutter CR, Lambert SM, Wiens JJ. 2017.** Rapid diversification and time explain amphibian
1435 richness at different scales in the Tropical Andes, Earth’s most biodiverse hotspot. *The*
1436 *American Naturalist* **190**: 828–843.
- 1437 **iNaturalist. 2022a.** iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset
1438 <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2022-10-01.
1439 <https://www.gbif.org/occurrence/3859918443>).
- 1440 **iNaturalist. 2022b.** iNaturalist Research-grade Observations. iNaturalist.org. Occurrence dataset
1441 <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accessed via GBIF.org on 2022-10-01.
1442 <https://www.gbif.org/occurrence/3039392786>).
- 1443 **Jaramillo C. 2019.** 140 million years of tropical biome evolution. In: Gómez J, Pinilla–Pachón
1444 AO, eds. *The Geology of Colombia, Volume 2 Mesozoic*. Publicaciones Geológicas Especiales
1445 36. Bogotá, Colombia: Servicio Geológico Colombiano 209–236.
- 1446 **Karger DN, Nobis MP, Normand S, Graham CH, Zimmermann NE. 2021.** CHELSA-
1447 TraCE21k V1.0. Downscaled transient temperature and precipitation data since the last glacial
1448 maximum. *Climate of the Past Discussions*: 1-27.
- 1449 **Kerckhoff AJ, Moriarty PE, Weiser MD. 2014.** The latitudinal species richness gradient in New
1450 World woody angiosperms is consistent with the tropical conservatism hypothesis. *Proceedings*
1451 *of the National Academy of Sciences* **111**: 8125–8130.

1452 **Kobayashi S, Abe S, Matsuki R. 2013.** Genetic structure of a Japanese brown frog (*Rana*
1453 *japonica*) population implies severe restriction of gene flow caused by recent urbanization in a
1454 satoyama landscape. *Mitochondrial DNA* **24**: 697–704.

1455 **Kobayashi S, Abe S, Tomita M, Matsuki R. 2018.** Fine-scale genetic structure and estimation
1456 of gene flow of the Japanese brown frog *Rana japonica* in a Satoyama landscape on the Western
1457 Side of Inba Lake, Eastern Japan. *Current Herpetology* **37**: 11-22.

1458 **Kong WS. 1996.** The distribution of dicotyledons in time and space in the Korean Peninsula. *The*
1459 *Korean Journal of Quaternary Research* **10**: 1–18.

1460 **Lampert KP, Rand AS, Mueller UG, Ryan MJ. 2003.** Fine-scale genetic pattern and evidence
1461 for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* **12**:
1462 3325–3334.

1463 **Lanfear R, Calcott B, Ho SY, Guindon S. 2012.** PartitionFinder: combined selection of
1464 partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and*
1465 *Evolution* **29**: 1695–1701.

1466 **Leigh J, Bryant WD. 2015.** PopART: Full-feature software for haplotype network construction.
1467 *Methods Ecology Evolution* **6**: 1110–1116.

1468 **Liu GW, Leopold EB. 1994.** Climatic comparison of Miocene pollen floras from northern East-
1469 China and south-central Alaska, USA. *Paleogeography, Paleoclimatology and Paleobotany*
1470 **108**: 217–228.

1471 **Lynch RL, Sebastian K, Ayala-Varela F, Hamilton PS, Ron SR. 2014.** Rediscovery of
1472 *Andinophryne olallai* Hoogmoed, 1985 (Anura, Bufonidae), an enigmatic and endangered
1473 Andean toad. *Amphibian & Reptile Conservation* **8**: 1–7.

1474 **Lyra ML, Haddad CFB, de Azeredo-Espin AML. 2016.** Meeting the challenge of DNA
1475 barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI
1476 primers. *Molecular Ecology Resources* **17**: 966–980.

1477 **Maciel NM, Collevatti RG, Colli GR, Schwartz EF. 2010.** Late Miocene diversification and
1478 phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species
1479 group (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**: 787–797.

1480 **McCullagh P, Nelder JA. 2019.** Generalized linear models. Routledge.

1481 **Maddison WP, Maddison DR. 2010.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis,
1482 Version 2.73.

1483 **Manel S, Williams CH, Ormerod SJ. 2001.** Evaluating presence-absence models in ecology: the
1484 need to account for prevalence. *Journal of Applied Ecology* **38**: 921–931.

1485 **Martínez-Monzón A, Cuenca-Bescós G, Bisbal-Chinesta J, Blain H. 2021.** One million years
1486 of diversity shifts in amphibians and reptiles in a Mediterranean landscape: resilience rules the
1487 Quaternary. *Palaeontology* **64**:673–686.

1488 **Mendoza AM, Bolívar-García W, Vázquez-Domínguez E, Ibáñez R, Parra Olea G. 2019.** The
1489 role of Central American barriers in shaping the evolutionary history of the northernmost
1490 glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *PeerJ* **7**: e6115.

1491 **Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2012.** The CIPRES Science Gateway: enabling high-impact
1492 science for phylogenetics researchers with limited resources. In: *Proceedings of the 1st*
1493 *Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment: Bridging from*
1494 *the extreme to the campus and beyond*. Chicago, Illinois, USA: Association for Computing
1495 Machinery 1–8.

1496 **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988.** A simple salting procedure for extracting DNA from
1497 human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**: 215.

1498 **Mims MC, Phillipsen IC, Lytle DA, Kirk EEH, Olden JD. 2015.** Ecological strategies predict
1499 associations between aquatic and genetic connectivity for dryland amphibians. *Ecology* **96**: 1371–
1500 1382.

1501 **Mona S, Ray N, Arenas M, Excoffier L. 2014.** Genetic consequences of habitat fragmentation
1502 during a range expansion. *Heredity* **112**: 291–299.

1503 **Montoya-Marín M. 2019.** Variabilidad genética y estructura poblacional del sapo endémico de
1504 Colombia *Osornophryne percrassa* (Ruíz-Carranza y Hernández-Camacho, 1976) en
1505 Risaralda, Caldas y Quindío. Unpublished Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Básicas.
1506 Programa de Biología. Corporación Universitaria de Santa Rosa de Cabal UNISARC. Santa
1507 Rosa de Cabal.

1508 **Moraes LJ, Werneck FP, Réjaud A, Rodrigues MT, Prates I, Glaw F, Kok PJR, Ron SR,**
1509 **Chaparro JC, Osorno-Muñoz M, Dal Vechio F, Recoder RS, Marquez-Souza S, Rojas**
1510 **RR, Demay L, Hrbek T, Fouquet A. 2022.** Diversification of tiny toads (Bufonidae:
1511 Amazophrynella) sheds light on ancient landscape dynamism in Amazonia. *Biological Journal*
1512 *of the Linnean Society* **136**: 75–91.

- 1513 **Moritz C. 1994.** Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review.
1514 *Molecular Ecology* **3**: 401–411.
- 1515 **Morrone JJ. 2014.** Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events
1516 in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics* **30**: 202–214.
- 1517 **Mueses-Cisneros JJ, Cisneros-Heredia DF, McDiarmid RW. 2012.** A new Amazonian species
1518 of *Rhaebo* (Anura: Bufonidae) with comments on *Rhaebo glaberrimus* (Günther, 1869) and
1519 *Rhaebo guttatus* (Schneider, 1799). *Zootaxa* **3447**: 22–40.
- 1520 **Murphy MA, Evans JS, Storfer A. 2010.** Quantifying *Bufo boreas* connectivity in Yellowstone
1521 National Park with landscape genetics. *Ecology* **91**: 252–261.
- 1522 **Navas CA, Otani L. 2007.** Physiology, environmental change, and anuran conservation.
1523 *Phyllomedusa* **6**: 83–103.
- 1524 **Naimi B, Hamm NAS, Groen TA, Skidmore AK, Toxopeus AG. 2014.** Where is positional
1525 uncertainty a problem for species distribution modelling? *Ecography* **37**:191–203.
- 1526 **Naimi B, Araujo, MB. 2016.** sdm: a reproducible and extensible R platform for species
1527 distribution modelling. *Ecography* **39**: 368–375.
- 1528 **Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975.** The bottleneck effect and genetic variability in
1529 populations. *Evolution* **29**: 1–10.
- 1530 **Newnham RM, Lowe DJ. 2000.** Fine-resolution pollen record of late-glacial climate reversal
1531 from New Zealand. *Geology* **28**: 759–762.
- 1532 **Nuñez JJ, Wood NK, Rabanal FE, Fontanella FM, Sites JW Jr. 2011.** Amphibian
1533 phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial
1534 haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae).
1535 *Molecular Phylogenetics and Evolution* **58**: 343–352.
- 1536 **Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O’hara
1537 RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens HH, Szoecs E, Wagner H. 2013.** Package vegan
1538 *version 2*: 1–295.
- 1539 **Paz A, González A, Crawford AJ. 2019.** Testing effects of Pleistocene climate change on the
1540 altitudinal and horizontal distributions of frogs from the Colombian Andes: a species
1541 distribution modeling approach. *Frontiers of Biogeography* **11**: e37055.

1542 **Peacock MM, Beard KH, O'Neill EM, Kirchoff VS, Peters MB. 2009.** Strong founder effects
1543 and low genetic diversity in introduced populations of Coqui frogs. *Molecular Ecology* **18**:
1544 3603–3615.

1545 **Peery MZ, Kirby R, Reid BN, Stoelting R, Doucet-Ber E, Robinson S, Vásquez-Carrillo SC,**
1546 **Pauli JN, Palsbøll PJ. 2012.** Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent
1547 population declines. *Molecular Ecology* **21**: 3403–3418.

1548 **Peltier WR, Fairbanks RG. 2006.** Global glacial ice volume and Last Glacial Maximum duration
1549 from an extended Barbados sea level record. *Quaternary Science Reviews* **25**: 3322–3337.

1550 **Pereyra MO, Blotto BL, Baldo D, Chaparro JC, Ron SR, Elias-Costa AJ, Iglesias PP,**
1551 **Venegas PJ, Thomé MTC, Ospina-Sarria JJ, Maciel NM, Rada M, Kolenc F, Borteiro FC,**
1552 **Rivera-Correa M, Rojas-Runjaic FJM, Moravec J, De La Riva I, Wheeler WC,**
1553 **Castroviejo-Fisher S, Grant T, Haddad CFB, Faivovich J. 2021.** Evolution in the genus
1554 *Rhinella*: a total evidence phylogenetic analysis of Neotropical true toads (Anura: Bufonidae).
1555 *Bulletin of the American Museum of Natural History* **447**: 1–156.

1556 **Portik DM, Papenfuss TJ. 2015.** Historical biogeography resolves the origins of the endemic
1557 Arabian toad lineages (Anura: Bufonidae): evidence for ancient vicariance and dispersal events
1558 with the Horn of Africa and South Asia. *BMC Evolutionary Biology* **15**: 152.

1559 **Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006.** Maximum entropy modeling of species
1560 geographic distributions. *Ecological Modeling* **190**: 231–259.

1561 **Pramuk JB, Robertson T, Sites JW, Noonan BP. 2008.** Around the world in 10 million years:
1562 biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology*
1563 *Biogeography* **17**: 72–83.

1564 **Prance GT. 1981.** A review of the phytogeographic evidence for Pleistocene climate changes in
1565 the Neo tropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **69**:594–624.

1566 **Qiu YX, Fu CX, Comes HP. 2011.** Plant molecular phylogeography in China and adjacent
1567 regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the
1568 world's most diverse temperate flora. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**: 225–244.

1569 **Quintero I, Wiens JJ. 2013.** What determines the climatic niche width of species? The role of
1570 spatial and temporal climatic variation in three vertebrate clades. *Global Ecology and*
1571 *Biogeography* **22**: 422–432.

1572 **R Core Team. 2021.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for
1573 Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

1574 **Rambaut A. 2014.** FigTree version 4.2. A graphical viewer of phylogenetic trees. Available from
1575 left angle bracket <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> right angle bracket.

1576 **Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2014.** Tracer v1.6. Available from
1577 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

1578 **Ramírez-Barahona S, Eguiarte LE. 2013.** The role of glacial cycles in promoting genetic
1579 diversity in the Neotropics: the case of cloud forests during the Last Glacial Maximum. *Ecology*
1580 *and Evolution* **3**: 725–738.

1581 **Ramírez-Soriano A, Ramos-Onsins SE, Rozas J, Calafell F, Navarro A. 2008.** Statistical
1582 power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks
1583 with recombination. *Genetics* **179**: 555–567.

1584 **Ramos-Onsins SE, Rozas J. 2002.** Statistical properties of new neutrality tests against population
1585 growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 2092–2100.

1586 **Ramos EKS, de Magalhães RF, Sari EHR, Rosa AHB, Garcia PCA, Santos FR. 2018.**
1587 Population genetics and distribution data reveal conservation concerns to the sky island
1588 endemic *Pithecopus megacephalus* (Anura: Phyllomedusidae). *Conservation Genetics* **19**: 99–
1589 110.

1590 **Ravelo AC, Dekens PS, McCarthy M. 2006.** Evidence for El Niño–like conditions during the
1591 Pliocene. *Geological Society of America Today* **16**: 4–11.

1592 **Ray N, Currat M, Excoffier L. 2003.** Intra-deme molecular diversity in spatially expanding
1593 populations. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 76–86.

1594 **Reyes-Puig C, Bittencourt-Silva GB, Sánchez MT, Wilkinson M, Streicher JW, Maddock**
1595 **ST, Kotharambath R, Müller H, Angiolani Larrea FN, Almeida-Reinoso D, Ron SR,**
1596 **Cisneros-Heredia DF. 2019.** Rediscovery of the endangered Carchi Andean Toad, *Rhaebo*
1597 *colomai* (Hoogmoed, 1985), in Ecuador, with comments on its conservation status and
1598 extinction risk. *Check List* **15**: 415–419.

1599 **Rhoads EA, Williams PK, Krane CM. 2017.** High inbreeding and low connectivity among
1600 *Ambystoma texanum* populations in fragmented Ohio forests. *Ecology and evolution* **7**: 11135–
1601 11147.

1602 **Robertson JM, Lips KR, Heist EJ. 2008.** Fine scale gene flow and individual movements among
1603 subpopulations of *Centrolene prosoblepon* (Anura: Centrolenidae). *Revista de Biología*
1604 *Tropical* **56**: 13–26.

1605 **Rodríguez A, Börner M, Pabijan M, Gehara M, Haddad CF, Vences M. 2015.** Genetic
1606 divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in
1607 topographically complex regions. *Evolutionary Ecology* **29**: 765–785.

1608 **Rogers AR, Harpending H. 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise
1609 genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 552–569.

1610 **Ron SR, Mueses-Cisneros JJ, Gutiérrez-Cárdenas PDA, Rojas-Rivera A, Lynch RL, Rocha**
1611 **CFD, Galarza G. 2015.** Systematics of the endangered toad genus *Andinophryne* (Anura:
1612 Bufonidae): phylogenetic position and synonymy under the genus *Rhaebo*. *Zootaxa* **3947**: 347–
1613 366.

1614 **Ronquist F. 1997.** Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical
1615 biogeography. *Systematic Biology* **46**: 195–203.

1616 **Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liang,**
1617 **Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference
1618 and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.

1619 **Rosche C, Heinicke S, Hensen I, Silantyeva MM, Stolz J, Gröning S, Wesche K. 2018.** Spatio-
1620 environmental determinants of the genetic structure of three steppe species in a highly
1621 fragmented landscape. *Basic and Applied Ecology* **28**: 48–59.

1622 **Rowe GTJC, Beebee TJC, Burke T. 2000.** A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo*
1623 *calamita*, metapopulations. *Oikos* **88**: 641–651.

1624 **Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado, Ramos-Onsins SE,**
1625 **Sánchez-Gracia A. 2017.** DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data
1626 Sets. *Molecular Biology Evolution* **34**: 3299–3302.

1627 **Rull V. 2020.** Neotropical Diversification: Historical Overview and Conceptual Insights. In: Rull
1628 V, Carnaval A, eds. *Neotropical diversification: Patterns and processes*. Fascinating Life
1629 Sciences. Springer, Cham.

1630 **Salaman P. 2001.** The study of an understorey avifauna community in an Andean premontane
1631 pluvial forest. Unpublished Thesis, Wolfson College, University of Oxford, Oxford.

1632 **Sanchíz B. 1998.** Saliencia. Handbuch der Paläoherpetologie. In: Wellnhofer P, ed. Munich:
1633 Verlag Dr. Friedrich Pfeil 1–275.

1634 **Sandberger-Loua L, Rödel MO, Feldhaar H. 2018.** Gene-flow in the clouds: landscape genetics
1635 of a viviparous, montane grassland toad in the tropics. *Conservation Genetics* **19**: 169–180.

1636 **Santana-Cornélio G, Araújo-de-Oliveira E, Magalhães-Xavier K, Barros-da-Silva GW,**
1637 **Ribeiro Rodrigues LR, Hernández-Ruz EJ. 2020.** La estructura genética de *Pristimantis*
1638 *latro* (Anura: Craugastoridae) refleja rasgos de su historia de vida. *Revista de la Academia*
1639 *Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **44**: 729–739.

1640 **Savage JM. 2002.** The amphibians and reptiles of Costa Rica. A herpetofauna between two
1641 continents, between two seas. Chicago: The University of Chicago Press, 934 pp.

1642 **Shcheglovitova M, Anderson RP. 2013.** Estimating optimal complexity for ecological niche
1643 models: a jackknife approach for species with small sample sizes. *Ecological Modelling* **269**:
1644 9–17.

1645 **Smith TB, Kinnison MT, Strauss SY, Fuller TL, Carroll SP. 2014.** Prescriptive evolution to
1646 conserve and manage biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **45**:
1647 1–22.

1648 **Stynoski JL, Castro E, Vargas Ramirez O. 2013.** *Rhaebo haematiticus* (litter toad) and
1649 *Craugastor fitzingeri* (Fitzinger's rain frog) reproductive behavior. *Herpetological Review* **44**:
1650 129–130.

1651 **Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018.** Bayesian
1652 phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* **4**:
1653 vey016.

1654 **Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA
1655 polymorphism. *Genetic* **123**: 585–595.

1656 **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2016.** MEGA 4: molecular evolutionary genetics
1657 analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596–1599.

1658 **Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis SK. 1990.** The Genetic Consequences of Habitat
1659 Fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**: 13–27.

1660 **Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JG, Haddad CF, Baldissera FA Jr, Alexandrino J.**
1661 **2010.** Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic
1662 Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**: 1018–1031.

- 1663 **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTALW improving the sensitivity of
1664 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap
1665 penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- 1666 **Tihen JA. 1965.** A review of New World fossil bufonids. *American Midland Naturalist* **68**: 1–50.
- 1667 **Van Bocxlaer I, Loader SP, Roelants K, Biju SD, Menegon M, Bossuyt F. 2010.** Gradual
1668 adaptation toward a range-expansion phenotype initiated the global radiation of toads. *Science*
1669 **372**: 679–682.
- 1670 **Vanzolini PE, Williams EE. 1970.** South American anoles: the geographic differentiation and
1671 evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*
1672 **19**:125–298.
- 1673 **Vasconcelos-Tiago S, Nascimento Bruno TM, Prado Vitor HM. 2018.** Expected impacts of
1674 climate change threaten the anuran diversity in the Brazilian hotspots. *Ecology and Evolution*
1675 **8**: 7894–7906.
- 1676 **Vásquez DC, Correa L, Pastenes R, Palma E, Méndez MA. 2013.** Low phylogeographic
1677 structure of *Rhinella arunco* (Anura: Bufonidae), an endemic amphibian from the Chilean
1678 Mediterranean hotspot. *Zoological Studies* **52**: 1–11.
- 1679 **Velasco JA, Estrada F, Calderón-Bustamante O, Swingedouw D, Ureta C, Gay C, Defrance**
1680 **D. 2021.** Synergistic impacts of global warming and thermohaline circulation collapse on
1681 amphibians. *Communications Biology* **4**: 141.
- 1682 **Vitt LJ, Caldwell JP. 2014.** *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles.*
1683 Fourth edition. London: Elsevier, 757 pp.
- 1684 **Vuilleumier BS. 1971.** Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science* **173**:
1685 771–780.
- 1686 **Wang IJ. 2009.** Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the
1687 black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* **18**: 3847–3856.
- 1688 **Wang B, Jiang J, Xie F, Li C. 2012.** Postglacial colonization of the Qinling Mountains:
1689 phylogeography of the swelled vent frog (*Feirana quadranus*). *Plos one* **7**: e41579.
- 1690 **Wang IJ. 2012.** Environmental and topographic variables shape genetic structure and effective
1691 population sizes in the endangered Yosemite toad. *Diversity and Distributions* **18**: 1033–1041.

1692 **Wang IJ. 2013.** Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation:
1693 a multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation.
1694 *Evolution* **67**: 3403–3411.

1695 **Wang WJ, McKay BD, Dai CY, Zhao N, Zhang RY, Qu YH, Song G, Li S, Liang W, Yang**
1696 **XJ, Pasquet E, Lei FM. 2013.** Glacial expansion and diversification of an East Asian montane
1697 bird, the green-backed tit (*Parus monticolus*). *Journal of Biogeography* **40**: 1156–1169.

1698 **Warren DL, Seifert SN. 2011.** Ecological niche modeling in Maxent: the importance of model
1699 complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications* **21**: 335–
1700 342.

1701 **Wells KD. 2007.** *The ecology and behavior of amphibians*. Chicago: The University of Chicago
1702 Press, 1148 pp.

1703 **Wiens JJ. 2004.** Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin
1704 of species. *Evolution* **58**: 193–197.

1705 **Wiens JJ, Graham CH. 2005.** Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and
1706 conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 519–539.

1707 **Wiens JJ, Ackerly DD, Allen AP, Anacker BL, Buckley LB, Cornell HV, Damschen EI,**
1708 **Davies JT, Grytnes J-A, Harrison SP, Hawkins BA, Holt RD, McCain CM, Stephens PR.**
1709 **2010.** Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology.
1710 *Ecology letters* **13**: 1310–1324.

1711 **Yáñez-Muñoz MH, Batallas D, Franco-Mena D, Meza-Ramos PA, Oyagata LA, Padilla D,**
1712 **Paucar C, Reyes-Puig JP; Rodríguez MA, Urgilés-Merchán MA, Vega-Yáñez M. 2020.**
1713 *Anfibios en los Ecosistemas Andino-Tropicales de la provincia del Carchi*. Serie de
1714 Publicaciones del Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial del Carchi y el Instituto
1715 Nacional de Biodiversidad. 14:1–340. Quito, Ecuador: INABIO – GADPC.

1716 **Yáñez-Muñoz MH, Reyes-Puig JP, Batallas-Revelo D, Broaddus C, Urgilés-Merchán M,**
1717 **Cisneros-Heredia DF, Guayasamin JM. 2021.** A new Andean treefrog (Amphibia:
1718 *Hyloscirtus bogotensis* group) from Ecuador: an example of community involvement for
1719 conservation. *PeerJ* **9**: e11914.

1720 **Yang SJ, Dong HL, Lei FM. 2009.** Phylogeography of regional fauna on the Tibetan Plateau: a
1721 review. *Progress in Natural Science* **19**: 789–799.

- 1722 **Yu Y, Blair C, H XY. 2020.** RASP 4: Ancestral state reconstruction tool FOR multiple genes and
1723 characters. *Molecular Biology and Evolution* **37**: 604–606.
- 1724 **Zeisset I, Beebee TJC. 2008.** Amphibian phylogeography: a model for understanding historical
1725 aspects of species distributions. *Heredity* **10**: 109–119.
- 1726 **Zhao C, Jiang J, Xie F, Li C, Zhao T. 2022.** Assessment of Amphibians Vulnerability to Climate
1727 Change in China. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10.
- 1728 **Zink RM, Barrowclough GF. 2008.** Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography.
1729 *Molecular Ecology* **17**: 2107–2121.

1730

6. MATERIAL SUPLEMENTARIO

1731

1732 **6.1. Tabla S1.** Secuencias de especies y números de acceso en el GenBank.

1733

Especie	CXCR4	NAD2	12S	16S	RAG1
Ingroup Sampling					
<i>Amazophrynella minuta</i>	DQ306496	---	DQ158446	AY843582	---
<i>Anaxyrus americanus</i>	DQ306520	---	DQ158426	DQ158426	KJ609650
<i>Anaxyrus boreas</i>	DQ306499	JN868005	AY325983	AY325983	KJ609660
<i>Anaxyrus cognatus</i>	DQ306498	---	DQ158444	DQ158444	KJ609656
<i>Anaxyrus debilis</i>	DQ306507	---	DQ158449	DQ158449	DQ158371
<i>Anaxyrus exsul</i>	DQ306550	AF004524	DQ158450	DQ158450	DQ158372
<i>Anaxyrus fowleri</i>	DQ306505	---	DQ158451	DQ158451	DQ158373
<i>Anaxyrus microscaphus</i>	DQ306563	---	DQ158476	DQ158476	KJ609655
<i>Anaxyrus punctatus</i>	KX200386	---	DQ283160	DQ283160	KX208674
<i>Anaxyrus quercicus</i>	DQ306549	---	DQ158484	DQ158484	KJ609658
<i>Anaxyrus terrestris</i>	DQ306537	---	DQ158489	DQ158489	KJ609654
<i>Anaxyrus woodhousii</i>	DQ306551	---	DQ158498	DQ158498	KJ609653
<i>Ansonia longidigita</i>	---	---	DQ283341	DQ283341	---
<i>Ansonia muelleri</i>	---	---	AB435315	AB435315	---
<i>Atelopus flavescens</i>	---	DQ068437	DQ283259	EF364308	---
<i>Atelopus peruensis</i>	DQ306495	---	DQ158419	DQ158419	DQ158345
<i>Atelopus spumarius</i>	---	DQ068447	DQ283260	DQ283260	---
<i>Bufo bufo</i>	KF666057	DQ629612	AY325988	AY325988	AY583336
<i>Bufo cryptotympanicus</i>	---	---	AF160771	AF160789	---
<i>Bufo eichwaldi</i>	JN646906	---	JX218102	JX218102	---
<i>Bufo gargarizans</i>	DQ306531	---	MK031441	MK031441	DQ158353
<i>Bufo japonicus</i>	AB612061	---	LC104740	AB159586	AB612057
<i>Bufo stejnegeri</i>	MK031476	MK031564	MK031440	MK031440	MK031653
<i>Bufo tibetanus</i>	---	AY936839	AF160766	AF160784	---
<i>Bufo torrenticola</i>	JN653312	---	AB159465	AB159578	---
<i>Bufo tuberculatus</i>	---	---	AF160765	AF160783	---
<i>Bufo verrucosissimus</i>	FJ882705	---	KY555629	KY555652	MN433058
<i>Bufotes oblongus</i>	---	---	---	KT031478	KT031667
<i>Bufotes raddei</i>	KF666101	---	KF664854	KT223827	KF666186
<i>Bufotes viridis</i>	FJ882714	DQ629606	JX439781	KF992832	EU497603
<i>Capensibufo rosei</i>	KF666111	AF463795	AF220864	KF665447	KF666395
<i>Capensibufo tradouwi</i>	---	FN650115	AF220865	AF220912	---
<i>Duttaphrynus himalayanus</i>	FJ882688	KT031588	KT991334	MT982990	KT031691
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	KX200441	KY555677	DQ158475	DQ158475	KJ609681
<i>Incilius alvarius</i>	DQ306516	JN868006	DQ283269	DQ283269	KJ609663
<i>Incilius coccifer</i>	DQ306526	JN868015	DQ158443	DQ158443	KJ609669
<i>Incilius coniferus</i>	HM563902	JN868001	DQ283166	DQ283166	HM563988
<i>Incilius luetkenii</i>	DQ306565	JN868025	DQ158467	DQ158467	KJ609668
<i>Incilius mazatlanensis</i>	HM563914	JN868029	AY680254	AY680254	KJ609667
<i>Incilius nebulifer</i>	HM563917	JN868031	AY325985	AY325985	KJ609666
<i>Incilius yalliceus</i>	DQ306545	JN868041	DQ158493	DQ158493	KX208678
<i>Ingerophrynus biporcatus</i>	KY555668	---	AY325987	AY325987	KY555715
<i>Ingerophrynus divergens</i>	FJ882701	---	DQ283149	DQ283149	KF666187
<i>Ingerophrynus galeatus</i>	DQ306506	---	DQ283376	DQ283376	KY555720
<i>Ingerophrynus macrotis</i>	DQ306525	KY555693	DQ158468	DQ158468	KF666244
<i>Melanophryniscus klappenbachi</i>	KP295534	---	AY843699	AY843699	---
<i>Melanophryniscus stelzneri</i>	DQ306494	KY555690	DQ158421	DQ158421	KX208653

<i>Nannophryne_cophotis</i>	DQ306540	---	DQ158446	DQ158446	DQ158369
<i>Nectophryne_afra</i>	KF666002	---	DQ283360	DQ283360	MT721165
<i>Nectophryne_batesii</i>	KF666124	---	DQ283169	DQ283169	KF666398
<i>Oreophrynella_sp</i>	---	---	DQ158422	DQ158422	DQ158348
<i>Osornophryne_angel</i>	---	---	JF907459	JX412000	JX412090
<i>Osornophryne_antisana</i>	---	---	JX418269	JX412034	JX412105
<i>Osornophryne_bufoniformis</i>	---	---	JF907457	JX412023	JX412104
<i>Osornophryne_cofanorum</i>	---	---	JF907441	JX411979	JX412078
<i>Osornophryne_guacamayo</i>	---	---	JF907493	JX412028	JX412100
<i>Osornophryne_occidentalis</i>	---	---	JF907444	JX412020	JX412101
<i>Osornophryne_puruanta</i>	---	---	---	JX411987	JX412082
<i>Osornophryne_simpsoni</i>	---	---	JF907481	JX412037	JX412100
<i>Osornophryne_sumacoensis</i>	---	---	JF907462	JX412016	JX412096
<i>Pedostibes_hosii</i>	EF107449	---	AY325993	EF107163	KF666369
<i>Peltophryne_lemur</i>	DQ306513	---	DQ283273	DQ283273	DQ158386
<i>Phrynooidis_asper</i>	DQ306503	KY555704	DQ283148	DQ283148	KF666437
<i>Phrynooidis_juxtaspera</i>	DQ306542	---	DQ158463	DQ158463	KF666210
<i>Rhaebo_ceratophrys</i>	MW002852	---	MW003460	MW003622	MW003042
<i>Rhaebo_colomai</i>	---	---	KY845427	KP845427	KP892883
<i>Rhaebo_ecuadorensis</i>	DQ306510	---	DQ158455	DQ158455	DQ158377
<i>Rhaebo_guttatus</i>	DQ306497	---	DQ158459	DQ158459	KF666304
<i>Rhaebo_haematiticus</i>	DQ306501	JN868019	DQ283167	DQ283167	KJ609683.1
<i>Rhaebo_nasicus</i>	DQ306512	---	DQ158477	DQ158477	DQ158396
<i>Rhaebo_olallai</i>	---	---	KP845426	KP845426	KP892884
<i>Rhinella_amboroensis</i>	---	---	DQ283386	DQ283386	---
<i>Rhinella_arequipensis</i>	DQ306564	---	DQ158430	DQ158430	DQ158355
<i>Rhinella_arunco</i>	DQ306552	---	DQ158442	DQ158442	DQ158365
<i>Rhinella_atacamensis</i>	DQ306541	---	DQ158433	DQ158433	DQ158357
<i>Rhinella_castaneotica</i>	DQ306539	---	DQ158440	DQ158440	DQ158364
<i>Rhinella_chavin</i>	---	---	DQ158441	DQ158441	---
<i>Rhinella_crucifer</i>	KJ532322	KC198090	DQ158447	DQ158447	KJ609675
<i>Rhinella_dapsilis</i>	DQ306532	---	DQ158448	DQ158448	DQ158370
<i>Rhinella_festae</i>	DQ306521	---	DQ158479	DQ158423	DQ158349
<i>Rhinella_granulosa</i>	DQ306557	---	DQ158458	DQ158458	DQ158380
<i>Rhinella_humboldti</i>	KP684964	---	DQ158434	DQ158434	KP685131
<i>Rhinella_icterica</i>	---	GU907269	DQ158462	DQ158462	DQ158384
<i>Rhinella_limensis</i>	DQ306509	---	DQ158466	DQ158466	---
<i>Rhinella_margaritifera</i>	HM563889	KY555684	KR012594	KU495521	KF666178
<i>Rhinella_marina</i>	DQ306544	GU907290	DQ158474	DQ158474	KJ609672
<i>Rhinella_nesiotes</i>	DQ306500	---	DQ158478	DQ158478	DQ158397
<i>Rhinella_ocellata</i>	DQ306538	---	DQ158479	DQ158479	DQ158398
<i>Rhinella_poeppigii</i>	DQ306517	---	DQ158481	DQ158481	KJ609674
<i>Rhinella_rubescens</i>	---	GU907265	DQ158486	DQ158486	---
<i>Rhinella_schneideri</i>	DQ306528	---	DQ158480	DQ158480	KJ609673
<i>Rhinella_spinulosa</i>	DQ306566	---	DQ283046	---	KJ609676
<i>Rhinella_vellardi</i>	DQ306527	---	DQ158495	DQ158495	DQ158411
<i>Rhinella_veraguensis</i>	DQ306524	---	DQ158497	DQ158497	DQ158412
<i>Schismaderma_carens</i>	DQ306519	KY555682	AY325997	AY325997	KX208663
<i>Sclerophrys_brauni</i>	DQ306514	KY555692	DQ283416	DQ283416	KF666201
<i>Sclerophrys_camerunensis</i>	DQ306555	AF463789	DQ283358	DQ283358	KF666461
<i>Sclerophrys_garmani</i>	DQ306547	---	DQ158453	DQ158453	KF666415
<i>Sclerophrys_gracilipes</i>	DQ306522	---	DQ158456	DQ158456	KF666242
<i>Sclerophrys_gutturalis</i>	DQ306556	AF463779	DQ283436	DQ283436	KF666424
<i>Sclerophrys_kisoloensis</i>	DQ306560	AF463788	AY325995	AY325995	KF666361
<i>Sclerophrys_latifrons</i>	KF666133	KY555674	DQ283343	DQ283343	KF666272
<i>Sclerophrys_maculata</i>	DQ306533	AF463785	DQ283388	DQ283388	KF666462

<i>Sclerophrys_poweri</i>	DQ306559	AF463781	DQ158482	DQ158482	KF666328
<i>Sclerophrys_regularis</i>	DQ306523	DQ629609	DQ283163	DQ283163	KF666427
<i>Sclerophrys_steindachneri</i>	KF665937	KY555695	AY325981	AY325981	KF666409
<i>Sclerophrys_tuberosa</i>	KF665977	KY555688	DQ283362	DQ283362	KF666150
<i>Sclerophrys_xeros</i>	DQ306561	AF463786	DQ158499	DQ158499	KF666456
<i>Torrentophryne_aspinia</i>	---	---	AF160770	AF160787	---
<i>Vandijkophrynus_angusticeps</i>	KF666141	KY555699	AF220852	KF665390	KF666393
<i>Werneria_mertensiana</i>	KF666129	---	DQ283348	DQ283348	KF666411
<i>Wolterstorffina_parvipalmata</i>	FJ882719	---	DQ283346	DQ283346	KF666403
Outgroup Sampling					
<i>Leptodactylus_ocellatus</i>	DQ306492	---	DQ158417	DQ158417	DQ158343

1734