



Universidad del  
**Rosario**

**Sobreestimación de especies en el género *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) y la importancia del locus MC1R en delimitar su polimorfismo de color**

Diana Alexandra Arias Cárdenas

Director

Camilo Andrés Salazar Clavijo Ph.D.

Codirector

Lucas Santiago Barrientos Correa Ph.D.

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Bióloga

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas Pregrado en Biología Universidad del Rosario

Bogotá, 2020

**SOBREESTIMACIÓN DE ESPECIES EN EL GÉNERO *DENDROPSOPHUS* (ANURA: HYLIDAE) Y LA IMPORTANCIA DEL LOCUS MC1R EN DELIMITAR SU POLIMORFISMO DE COLOR**

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>6</b>
Muestreo de individuos y adquisición de secuencias en bases de datos	6
Extracción de ADN	7
Generación de amplicones para cada locus	8
Análisis filogenéticos y poblacionales	9
Análisis morfométricos	10
Análisis de polimorfismos de color	11
<b>RESULTADOS</b>	<b>12</b>
Análisis filogenéticos y poblacionales	12
Análisis morfométricos	15
Análisis de polimorfismos de color	15
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>19</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>19</b>
<b>TABLAS</b>	<b>24</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>25</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>33</b>

# **Sobreestimación de especies en el género *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) y la importancia del locus MC1R en delimitar su polimorfismo de color**

Alexandra Arias-Cárdenas<sup>1</sup>, Lucas S. Barrientos<sup>1</sup>, Camilo Salazar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

Correspondencia: dianaa.arias@urosario.edu.co

## **RESUMEN**

*Dendropsophus molitor* es una especie de rana de la familia Hylidae que se distribuye en la Cordillera Oriental de Colombia desde Boyacá hasta Norte de Santander. Esta especie está cercanamente emparentada a *D. luddeckei*, *D. pelidna* y *D. meridensis*, las cuales constituyen un clado cuyas relaciones internas entre linajes son controversiales. En este estudio se realizaron análisis morfológicos, filogenéticos y de estructura poblacional en poblaciones de *D. molitor* utilizando los genes mitocondriales 12S, 16S y COI y el gen nuclear POMC para evaluar la validez de la especie *D. luddeckei*. Adicionalmente, se determinó si las variaciones (SNPs) en el fragmento del gen MC1R se correlacionan con los polimorfismos de color encontrados en ambas especies. Del análisis filogenético se obtuvieron dos clados internos poco diferenciados que corresponden a la agrupación de las poblaciones por geografía. Así mismo, estadísticos de diversidad y diferenciación genética, caracteres morfológicos y análisis de delimitación de especies indicaron que *D. luddeckei* y *D. molitor* son una misma especie y no linajes independientes. Por último, los SNPs encontrados en el gen MC1R no se correlacionan con los polimorfismos de color de la especie *D. molitor* y no corresponden a los cambios previamente identificados en dendrobátidos.

**Palabras clave:** *Dendropsophus*, sobreestimación, polimorfismos de color, Receptor 1 de la Melanocortina (MC1R).

## **ABSTRACT**

The frog species *Dendropsophus molitor* belong to Hylidae family and is distributed in the Colombian Eastern Cordillera from Boyacá to Norte de Santander. This species is closely related to *D. luddeckei*, *D. pelidna* and *D. meridensis* which belong to a clade whose internal

relations between lineages are controversial. We performed morphological, phylogenetic and population structure analyzes in *D. molitor* populations using the mitochondrial genes 12S, 16S and COI and the nuclear gene POMC to assess the legitimacy of *D. luddeckei*. In addition, we determined whether the changes (SNPs) in the MC1R gene fragment are correlated to color polymorphisms found in both species. We obtained two slightly differentiated internal clades that cluster populations by geography in the phylogenetic analysis. Moreover, genetic diversity and genetic differentiation statistics, morphological traits and species delimitation analysis show that *D. luddeckei* and *D. molitor* are the same species instead of independent lineages. Finally, the SNPs found in the MC1R gene do not correlate to *D. molitor* color polymorphisms and do not correspond to the changes previously identified in dendrobatid species.

**Key Words:** *Dendropsophus*, overestimation, color polymorphisms, Melanocortin 1 Receptor (MC1R).

## INTRODUCCIÓN

La correcta determinación de especies es crucial para establecer la diversidad biológica existente en la naturaleza. La asignación de dichas entidades biológicas en “grupos diferenciables” es fundamental para abordar y entender los factores que inciden en su formación, evolución, distribución y ecología. Esto es particularmente complejo en taxa donde la variación morfológica utilizada para delimitar estas entidades es lábil o inexistente (Chenuil *et al.*, 2019). Normalmente individuos con estas características son asignados a complejos de especies o bajo la denominación de “especies crípticas” (Chenuil *et al.*, 2019) sin una verdadera clasificación taxonómica dentro de ellos. El advenimiento de métodos de biología molecular ha permitido en algunos casos delimitar correctamente linajes bien diferenciados (Bickford *et al.*, 2007) como verdaderas especies crípticas (bajo el concepto filogenético de especie). Sin embargo, su incorrecto uso también ha causado una sobreestimación en la diversidad de muchos linajes debido, la mayoría de las veces, a que las subespecies son ascendidas al rango de especies (Zachos, 2014). Struck *et al.* (2018) sugieren que la inferencia de especies crípticas requiere de una aproximación interdisciplinaria que combine la mayor cantidad de datos posibles, siendo estos taxa evaluados estadísticamente en comparación con especies del mismo grupo que claramente son morfológicamente distinguibles. Esta comparación solo puede realizarse de manera directa cuando ambos tipos de linajes (crípticos y diferenciables) están presentes en un mismo género.

La importancia de un adecuado reconocimiento de especies crípticas en la herpetofauna recae en formular un contexto taxonómico adecuado para la toma de decisiones teóricas y prácticas (Donnellan *et al.*, 1993). El problema de una correcta delimitación de especies es particularmente complicado en anfibios neotropicales (Rivera-Correa & Gutiérrez-Cárdenas, 2012), en ocasiones la poca diferenciación morfológica entre los individuos aunado a que generalmente otros aspectos de su ecología y rasgos de vida son desconocidos dificulta su correcta identificación y clasificación. Los anfibios, a diferencia de otros vertebrados, tienen un número relativamente pequeño de caracteres externos útiles para la identificación de especies (p. ej. coloración y estructura de la piel o proporción corporal) (Litvinchuk *et al.*, 2004). Esta puede ser la razón por la cual el número de especies crípticas en este linaje es mayor que en otros grupos, como es evidente por el número de publicaciones correspondientes (Litvinchuk *et al.*, 2004).

El éxito ecológico de los anfibios en los Andes tropicales y subtropicales es evidente, pues se han registrado más de 800 especies que habitan estos ecosistemas. Más de 700 especies son anuros, los cuales son particularmente diversos en altas elevaciones, como evidencian varios estudios en países como Colombia (Navas, 2006). La especie *Dendropsophus molitor* (Schmidt, 1857) conocida comúnmente como rana andina, se encuentra en la Cordillera Oriental de Colombia y su distribución geográfica comprende los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Santander y Norte de Santander, entre los 2.000 y 3.600 msnm (Guarnizo *et al.*, 2014). Es una especie común en zonas intervenidas como potreros, bordes de carreteras y centros poblados (Ruiz-Carranza *et al.*, 1996) debido a su tolerancia a la presencia antrópica y su amplia distribución altitudinal. Sin embargo, su presencia está condicionada a la existencia de lagunas o charcas que utilizan tanto los adultos como los renacuajos (Guarnizo *et al.*, 2014). Esta especie hace parte del grupo *D. molitor*, comprendido por *D. pelidna*, *D. meridensis* y *D. luddeckei*, pero todo este grupo carece de caracteres que lo definan (Faivovich *et al.*, 2005).

Esta especie ha sido modelo de estudio en diferentes investigaciones enfocadas a preguntas sobre biogeografía, comportamiento, ecofisiología, biología reproductiva, filogeografía e incluso ontogenia (Arenas-Rodríguez *et al.*, 2018; Guarnizo *et al.*, 2009; 2012; Ruiz-Carranza *et al.*, 1996). No obstante, aunque esta especie es un importante modelo de estudio, existe controversia alrededor de la diferenciación genética de sus poblaciones dada su amplia distribución. En 2009, Guarnizo *et al.* utilizando los genes mitocondriales Citocromo b (cyt b), Citocromo Oxidasa 1 (COI) y el gen nuclear de la proopiomelanocortina (POMC), encontraron

dos clados definidos (Clado Norte y Clado Sur) altamente divergentes ( $F_{st} = 0.93$ ) que se encuentran distribuidos (norte-sur) a lo largo de la Cordillera Oriental de Colombia. Los autores atribuyen que la diferenciación entre las poblaciones es ocasionada por vicarianza y se sugiere que existe aislamiento reproductivo. Posteriormente, Guarnizo *et al.* (2012) determinaron que los rasgos acústicos (cantos de anuncio), pero no morfológicos, difieren significativamente entre los clados. A razón de esto, establecieron con base en las señales acústicas y la variación genética que los dos clados constituyen especies crípticas que tienen distribución parapátrica. La nueva especie denominada *Dendropsophus luddeckei* (Clado del Norte) fue establecida como una especie válida soportada por divergencia genética en los marcadores anteriormente mencionados y en los genes 12S y 16S. En este estudio se evaluará la validez de estos dos linajes de *Dendropsophus* con un muestreo mayor al usado por Guarnizo *et al.* y analizando datos tanto moleculares como morfológicos.

Por otro lado, aprovechando el amplio muestreo poblacional y la existencia de varios morfotipos dentro de *Dendropsophus molitor* también se evaluó si el gen Receptor de Melanocortina 1 (MC1R), responsable de los fenotipos más oscuros en algunos dendrobátidos (Posso-Terranova & Andrés, 2017), está involucrado en los patrones de coloración observados en esta especie. En particular para anfibios se han explorado algunos mecanismos genéticos asociados a la coloración en la familia Dendrobatidae *sensu lato* (Summers *et al.*, 2004; Vestergaard *et al.*, 2015; Posso-Terranova & Andrés, 2017; Stuckert *et al.*, 2019), pero este tipo de estudios no han sido realizados en otros grupos de ranas neotropicales como *Dendropsophus molitor*. En esta especie no hay información suficiente respecto a la función de la coloración y de sus bases genéticas. El estudio de la pigmentación en este caso es interesante debido a que la especie presenta tres patrones de coloración definidos: verde sólido, variegado (verde y marrón) y marrón sólido (figura 1). Dado que el gen MC1R es el locus causal de los patrones de melanización en muchos vertebrados (Hubbard *et al.*, 2010) y que existe asociación fenotipo - genotipo entre ciertas variantes genéticas en este gen y el patrón de melanina en Dendrobatidae, en este estudio se explorará si esas mismas variantes (SNPs de su sigla en inglés) explican el polimorfismo de *Dendropsophus molitor*.

## **METODOLOGÍA**

### ***Muestreo de individuos y adquisición de secuencias en bases de datos***

Se utilizaron 19 tejidos de individuos de la especie *Dendropsophus molitor* provenientes de 2 poblaciones diferentes (figura 2, anexo 1) de Cundinamarca depositados en la colección biológica de la Universidad de los Andes ANDES-A. Los tejidos empleados corresponden solo a aquellos ejemplares que contaban con fotografías que permitieron definir su morfotipo. Para complementar este muestreo, se colectaron 6 individuos más en la ciudad de Tunja (rango de distribución de *D. luddeckei*) (figura 2, anexo 1) mediante captura de tipo manual (Gallina-Tessaro & López-González, 2012) en un proceso de inspección visual libre. El muestro se realizó en dos jornadas nocturnas en un periodo promedio de 3 horas cada una. Al capturar los individuos, se utilizaron bolsas herpetológicas para su traslado al laboratorio de Genética Evolutiva de la Universidad del Rosario, donde se llevó a cabo un registro fotográfico de cada ejemplar para determinar su morfotipo. Una vez los individuos fueron fijados siguiendo el protocolo de Simmons (2002), las muestras de tejido de hígado y músculo fueron preservadas en etanol al 96% libre de pirimidina para su posterior almacenaje en colección.

Adicionalmente, se incluyó el muestreo que Guarnizo *et al.* realizó para las especies *Dendropsophus molitor* y *Dendropsophus luddeckei* (anexo 2). Se descargaron todas las secuencias disponibles en la base de datos NCBI para los genes 12S (19), 16S (21), COI (16) y POMC (226) usando la línea de comando Entrez: “esearch -db nucleotide –query “<organism> GENE" | efetch -format fasta” (Nascimento *et al.*, 2019). Para el gen MC1R fueron descargadas las secuencias existentes (20) para la especie *Oophaga histrionica* (anexo 2) previamente publicadas del estudio de Posso-Terranova & Andrés (2017).

### ***Extracción de ADN***

El ADN fue extraído de tejido hepático o muscular de los ejemplares que se encontraban preservados en etanol al 96%. El Protocolo de Extracción empleado se basa en el aislamiento de ADN por perlas magnéticas estandarizado previamente en el laboratorio. El tejido fue macerado en buffer de lisis (180 µl) y posteriormente se le agregó 20 µl de proteinasa K (mezclando por inversión) para luego incubar a 56 °C durante 24 horas. Posterior al tiempo de incubación, se agregaron 360 µl de solución de perlas magnéticas a cada muestra, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y los tubos se colocaron en un rack magnético durante 10 minutos. Se removió el sobrenadante de los tubos sin retirarlos del rack y se realizaron dos lavados con 700 µl de etanol al 70%. Finalmente, se agregó 70 µl de Buffer TE (pH 8) a cada muestra. La concentración del ADN fue cuantificada en NanoDrop (Thermo Scientific™).

### ***Generación de amplicones para cada locus***

Los genes mitocondriales 12S, 16S, COI y el gen nuclear POMC fueron amplificados mediante cuatro pares de primers previamente publicados (Guarnizo *et al.*, 2009; Guarnizo *et al.*, 2012). Se realizaron todas las reacciones de amplificación utilizando el Master Mix de Thermo Scientific™ y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes 12S y 16S constaba de una denaturación inicial de 94°C x 2min, seguido de 35 ciclos de amplificación (94°C x 30seg, 53°C x 30seg, 72°C x 60seg) y una extensión final de 72°C x 7min. El gen COI fue amplificado en un ciclo que constaba de una denaturación inicial de 95°C x 2min, seguido de 35 ciclos de amplificación (95°C x 30seg, 45°C x 45seg, 72°C x 1min) y una extensión final de 72°C x 10min. Finalmente, para el gen POMC se realizó una denaturación inicial de 96°C x 6min, seguido de 35 ciclos de amplificación (96°C x 45seg, 51°C x 45seg, 72°C x 1:30min) y una extensión final de 72°C x 6min. Los amplicones de 12S, 16S y POMC fueron purificados mediante el protocolo “Enzymatic PCR Cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline” de New England BioLabs<sub>INC</sub>. Los productos de PCR obtenidos para el gen COI fueron purificados mediante el protocolo de GELase (Epicentre Technologies Corp.) estandarizado previamente en el laboratorio. La secuenciación Sanger de las muestras se realizó en Elim Biopharmaceuticals, Inc y en Macrogen, Inc.

El gen nuclear receptor de melanocortina 1 (MC1R) se amplificó usando los primers publicados previamente por Posso-Terranova & Andrés (2017). Se realizó la reacción de amplificación utilizando las perlas de PCR illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™. El ciclo de PCR incluyó un *touch-up* que constaba de una denaturación inicial de 94°C x 5min, seguido de 20 ciclos de amplificación (94°C x 45seg, 52°C x 45seg, 72°C x 45seg), 35 ciclos de amplificación (92°C x 30seg, 55°C x 30seg, 72°C x 30seg) y una extensión final de 72°C x 10min. Posteriormente, se realizó el corte de las bandas obtenidas en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se realizó una reamplificación del fragmento previamente purificado con GELase (Epicentre Technologies Corp.). Para el ciclo de la reamplificación se realizó una denaturación inicial de 95°C x 5min, seguido de 30 ciclos de amplificación (94°C x 45seg, 60°C x 45seg, 72°C x 45seg) y una extensión final de 72°C x 10min. Los productos reamplificados fueron purificados mediante el protocolo “Enzymatic PCR Cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline” de New England BioLabs<sub>INC</sub>. La secuenciación Sanger de las muestras se realizó en Macrogen, Inc.

## *Análisis filogenéticos y poblacionales*

Todos los cromatogramas fueron limpiados y las secuencias consenso obtenidas fueron alineadas mediante el software Geneious Prime versión 2020.0.3. Adicional a las muestras secuenciadas en este estudio, se descargaron secuencias previamente publicadas en la base de datos de NCBI de todas las especies del género *Dendropsophus* secuenciadas para 12S, 16S, POMC y COI (anexo 2). Con el total de las secuencias obtenidas se realizaron los alineamientos por cada gen con el algoritmo *Geneious aligner* implementado en Geneious Prime versión 2020.0.3. Posteriormente, se exportaron cada uno de los alineamientos definiendo como Ns las regiones flanqueantes carentes de información. Para reconstruir los haplotipos del gen POMC se utilizó el programa PHASE contenido en DNAsp v6 (Librado & Rozas, 2009). Para la definición de los modelos de sustitución que más se ajustaban a los datos se utilizó el programa Jmodeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012). El modelo que mejor explicó los datos en el caso de los loci mitocondriales 12S y 16S fue GTR+I+G (AIC = 42158.6775). El mismo análisis sugirió el modelo TIM2+I+G para el gen nuclear POMC (AIC = 4247.247) y el modelo TPM3u+G para el gen mitocondrial COI (AIC = 4090.343). Se concatenaron los genes 12S y 16S para los análisis filogenéticos dado que presentaron el mismo modelo de sustitución (COI se analizó de manera independiente debido a la presencia de muchos individuos carentes de información para este gen). Para el caso de POMC y COI dado que los modelos de mejor ajuste no se encuentran explícitos dentro de la opción de reconstrucción filogenética escogida en bayesiano (ver abajo) se implementó el modelo GTR+I+G con la estimación de las frecuencias de las bases. El grupo externo para el árbol filogenético del concatenado 12S-16S fue *D. allenorum*, para COI fue *D. minutus* y para POMC fue *D. microcephalus* (anexo 2).

Las relaciones filogenéticas se establecieron con dos métodos diferentes de estimación: Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI). La reconstrucción filogenética utilizando ML se realizó mediante el software RAxML 8.2.11 (Stamatakis, 2014) para los loci mitocondriales (12S y 16S) y con IQ-tree (Nguyen *et al.*, 2014) para el gen COI y POMC. En el caso de los genes 12S y 16S el soporte de los nodos fue establecido con bootstraps, donde el número de réplicas fue determinado por el programa mediante la función autoMRE que establece la cantidad adecuada de árboles requeridos en cada caso. Los soportes de las ramas para el gen COI y POMC fueron obtenidos a partir de 5.000 réplicas de bootstrap. Para los árboles filogenéticos realizados por inferencia Bayesiana se utilizó el software BEAST2 v2.4.4 (Bouckaert *et al.*, 2014) y se empleó el modelo coalescente para poblaciones de tamaño

constante (utilizando el prior por defecto del modelo) para todos los loci dada la baja divergencia entre los taxa estudiados y la presunta panmixia de estos anuros. Se estableció una longitud de la cadena MCMC de 10'000.000 pasos, muestreando una topología cada 100 ciclos y se descartó el 10% de las muestras iniciales (*burn-in*). Las distribuciones de probabilidad posterior de los parámetros y la convergencia de la cadena ( $ESS > 200$ ) se inspeccionó en el software Tracer v1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). Todos los árboles filogenéticos obtenidos (BI y ML) fueron visualizados en el software Fig Tree v1.4.4 (Rambaut, 2014).

Para evaluar estadísticamente la existencia del linaje de *Dendropsophus luddeckei*, se implementó el test de delimitación de especies “*Integration of genes and traits for Bayesian Phylogenetics and Phylogeography*” (iBPP; Solís-Lemus *et al.*, 2014) utilizando los datos mitocondriales (12S-16S; loci sin individuos faltantes). El análisis se corrió usando el parámetro Theta por defecto (3 - 0.004; este rango incluye el estimador obtenido de los datos) y el parámetro Tau = 0.213 (escalar del tiempo de divergencia). El parámetro Tau fue calculado empleando la fórmula:  $Tau = \mu/2 * T$ , con el límite inferior de la tasa de mutación ( $\mu$ ) reportada para mitocondrial ( $14.8 \times 10^{-9}$  sustituciones por sitio por año) en anuros (Crawford, 2003) y el tiempo de divergencia (T) entre *D. molitor* y *D. pelidna* con un valor de  $7.2 \times 10^6$  años (Kumar *et al.*, 2017).

Para cada locus/especie (*D. molitor* y *D. luddeckei*) se estimaron estadísticas de diversidad y diferenciación genética. Se calculó la diversidad nucleotídica ( $\Phi$ ), la tasa de sustitución poblacional ( $\theta$ ), el índice de fijación (Fst) y la divergencia absoluta entre poblaciones (Dxy) con DNAsp v6 (Librado & Rozas, 2009). A partir de estos estimadores y la tasa de mutación mencionada anteriormente ( $14.8 \times 10^{-9}$  -  $24.5 \times 10^{-9}$ ), se estimó el tamaño efectivo de las hembras (Nef) mediante la fórmula:  $Nef = \theta/2 * \mu$ . Para el caso de POMC se utilizó la tasa de mutación reportada previamente para genes nucleares ( $0.924 \times 10^{-9}$  -  $1.53 \times 10^{-9}$ ; Crawford, 2003). También, se calcularon las distancias genéticas entre especies para cada gen utilizando MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) y se construyeron redes de haplotipos por cada uno de los genes con POPART v1.7. con el algoritmo TCS (Clement *et al.*, 2002). Finalmente, se evaluó si la diferenciación genética entre poblaciones presenta un patrón de aislamiento por distancia. Para esto, se linealizaron los valores de Fst y las distancias geográficas fueron convertidas a distancias mínimas entre pares de puntos con la función distGeo del paquete de R geosphere v1.5-10. Adicionalmente, se implementó un Test de Mantel.

### ***Análisis morfométricos***

Se examinaron 17 individuos depositados en la colección de la Universidad de los Andes ANDES-A. y 6 individuos colectados en el presente estudio que se incluyen en el rango de distribución de *D. luddeckei*. Los individuos fueron sexados a través de la observación de la presencia de sacos gulares, hendiduras bucales y cortes histológicos para confirmar la presencia de testículos u ovarios. Posteriormente todos los individuos fueron medidos con un calibrador Mitutoyo. Las medidas corporales realizadas a cada individuo fueron: longitud rostro-cloaca (SVL), longitud de la tibia (TBL), longitud del pie (FL), longitud de la cabeza (HL), ancho de la cabeza (HW), distancia interorbital (IOD), diámetro del ojo (ED), distancia ojo-narina (END), diámetro del tímpano (TD) y distancia ojo-tímpano (ETD) siguiendo el protocolo de Watters *et al.*, 2016.

Para contar con representatividad de individuos de la especie *D. luddeckei* se utilizaron datos morfométricos proporcionados por Guarnizo *et al.* no disponibles en su publicación del año 2012. En los análisis se emplearon datos únicamente de individuos machos (n = 54) dada la poca representatividad de las hembras en ambas especies. Se realizaron pruebas de normalidad para todas las variables (Test de Shapiro–Wilk y gráficos Q-Q en RStudio v1.2.5019). Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para seleccionar las variables que explican la mayoría de la varianza morfológica de los individuos y con estos componentes se realizó un Análisis Discriminante (DAPC) para evaluar si existe algún tipo de agrupación de los mismos. Por último, se evaluó estadísticamente si la morfología es explicada por la categoría especie con un Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA). Los tres análisis fueron realizados en RStudio v1.2.5019.

### ***Análisis de polimorfismos de color***

Teniendo presente la variación fenotípica en el color entre los individuos estudiados, se evaluó si las variantes identificadas previamente en el gen MC1R en *Oophaga histrionica* como asociadas a morfotipos, presentan también algún tipo de asociación con los morfotipos de *Dendropsophus molitor*. Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio para esta especie y las secuencias de *Oophaga histrionica* pertenecientes a la investigación de Posso-Terranova & Andrés (2017) del gen MC1R mediante el algoritmo *Geneious aligner* implementado en Geneious Prime versión 2020.0.3. Posteriormente, se evaluó si los SNPs encontrados en el fragmento amplificado para *Dendropsophus molitor* se correlacionaban con los polimorfismos de color registrados en las fotografías de cada individuo secuenciado (verde sólido, marrón sólido o variegado). Así mismo, se determinó si los SNPs identificados en las

secuencias de la especie *Oophaga histrionica* correspondían a los encontrados en las secuencias obtenidas para *Dendropsophus molitor*.

## RESULTADOS

Con la colecta de individuos realizada en esta investigación se obtuvieron especímenes de localidades poco representadas en estudios previos. Por tanto, se logró una ampliación en el muestreo de la especie *D. molitor* al incluir mayor cantidad de individuos del departamento de Cundinamarca, principalmente de Bogotá y Cajicá (figura 2). Así mismo, se remuestreo la localidad de Tunja en la cual se encuentra *D. luddeckei*, de forma que este estudio cuenta con representatividad de las regiones que corresponden a la distribución más al norte y sur de estas especies.

### *Análisis filogenéticos y poblacionales*

Se obtuvo un fragmento de 1.526 pb para la región mitocondrial 12S-16S, un fragmento de 636 pb para el gen COI y un fragmento de 479 pb para el gen nuclear POMC. La relación entre *D. molitor* y *D. luddeckei* fue evaluada en un contexto filogenético del género *Dendropsophus*, en donde se incluyeron todas las especies disponibles para cada marcador (anexo 3, 5, 7). Sin embargo, el grupo focal de este estudio es precisamente estas dos especies. Para el concatenado 12S-16S ambas topologías (ML y BI) fueron concordantes a excepción de tres discrepancias (ver abajo). Los individuos de las especies *D. molitor* y *D. luddeckei* conforman un clado monofilético consistente en ambos análisis (pp = 1, bootstrap = 69; figura 3), el cual es hermano de *D. carnifex* (pp = 1, bootstrap = 100, figura 3). Sin embargo, los individuos de *D. molitor* y *D. luddeckei* se distribuyen en dos clados internos poco diferenciados que corresponden a la agrupación de las poblaciones por geografía. Uno de ellos agrupa las poblaciones del norte (pp = 1, bootstrap = 97; figura 3) y el otro las del sur (pp = 0.8, bootstrap = 83; figura 3). El clado Norte en este estudio contiene individuos de *D. molitor* y de *D. luddeckei*, mientras el clado Sur está mayoritariamente conformado por individuos de *D. molitor* (excepto un individuo de *D. luddeckei* que se agrupa en este clado).

La primera diferencia obtenida entre la topología de ML y BI radica en que el clado Norte obtenido por el análisis BI posee como clado hermano un grupo de individuos de *D. molitor* (pp = 0.8, anexo 4) que pertenecen a localidades del sur (97002, 97006, QULC 97005, anexo 1). Por tanto, en comparación a la topología de ML, el clado Sur no es monofilético en este

caso. En segundo lugar, un grupo conformado por los individuos de las localidades Cocuy, Cueva y Laureles se encuentra ubicado como un clado hermano fuera de las establecidas agrupaciones Norte y Sur en el caso de ML (bootstrap = 69, figura 3). En contraste, para la topología con BI se obtiene que dicho clado es hermano al clado Norte (pp = 0.9, anexo 4). Por último, las especies *D. Pelidna* y *D. meridensis* constituyen un clado monofilético hermano al clado obtenido para *D. molitor* y *D. luddeckei* en la topología de ML (bootstrap < 50, figura 3); mientras que para BI dichas especies son hermanas exclusivamente del clado Norte (p = 0.8, anexo 4).

En concordancia al resultado previo, en las topologías construidas para COI (tanto ML como BI) los individuos constituyen dos clados agrupados por geografía (pp = 1, bootstrap = 100; figura 4) que corresponden nuevamente al clado Norte y clado Sur. La mitad de los individuos del clado Sur son de la especie *D. luddeckei*, los demás son de la especie *D. molitor* (pp = 1, bootstrap = 76; figura 4). En el clado Norte se encuentra mayor cantidad de individuos de *D. molitor* a excepción de 3 individuos de *D. luddeckei* (pp = 1, bootstrap = 68, figura 4). Todas las relaciones al interior del clado Sur son consistentes en ML y BI, mientras que en el clado Norte se observa una discrepancia. La agrupación conformada por dos individuos *D. molitor* (P4 y S1) en la topología BI (pp = 0.9, anexo 6) se ubica como un clado monofilético hermano al clado que contiene la mayor cantidad de individuos del Norte; mientras que el árbol ML (bootstrap < 50, figura 4) se encuentra al interior de dicho clado. Adicionalmente, otros individuos se encuentran en diferentes ubicaciones dentro del clado y se agrupan de forma diferente (O3, Q2, M1 y N2) en cada topología, sin embargo, presentan bajos soportes.

Para el gen nuclear POMC no se obtiene ningún grado de diferenciación geográfica o por especie entre los individuos. Ambas especies constituyen un clado monofilético consistente en las dos topologías (bootstrap = 99, pp = 1, anexo 7). Los clados obtenidos con los genes mitocondriales no se recuperan en este caso y los individuos de la especie *D. luddeckei* son agrupados en múltiples clados (que poseen una diferenciación mínima < 0.008) con los individuos de la especie *D. molitor*. Los análisis mostraron inconsistencias en algunos individuos que son ubicados en diferentes clados; no obstante, los soportes de estas agrupaciones son bajos y también, la diferenciación entre clados es muy reducida. Cabe resaltar que la especie *D. meridensis* fue incluida al interior del clado conformado por *D. molitor* y *D. luddeckei* en ambos análisis (bootstrap = 53, pp < 0.5, anexo 7), demostrando así la poca diferenciación existente en este gen.

Para el análisis de delimitación de especies por iBPP se utilizó un árbol simplificado derivado a partir de las relaciones obtenidas para los datos concatenados de 12S-16S (ML y BI, figura 5). El análisis reconoce como especies en clados altamente soportados (98-100) a todas las demás especies del género *Dendropsophus* que fueron utilizadas para proveer el contexto filogenético. Por el contrario, el clado compuesto por *D. molitor*, *D. luddeckei*, *D. pelidna* y *D. meridensis* y sus relaciones al interior poseen un soporte bajo considerándose como 4 especies definidas. En este clado *D. pelidna* y *D. meridensis* poseen un soporte de 31, el cual es menor al de todas las demás especies evaluadas. Por último, con respecto al grupo focal de este estudio se obtiene que *D. molitor* y *D. luddeckei* no son especies altamente soportadas (63) con relación a otras especies del género.

Las estadísticas de diversidad y diferenciación genética estimadas para cada locus/especie se encuentran reportadas en la tabla 1. En general, la diversidad genética entre especies es baja para todos los marcadores (especialmente para POMC) a excepción de COI. Se obtuvo la mayor tasa de sustitución y de diversidad nucleotídica para *D. molitor* en todos los casos y la distancia genética entre especies fue mayor para los genes mitocondriales en comparación al gen POMC. Los valores p obtenidos indican una diferenciación significativa para todos los marcadores excepto POMC. Para el tamaño efectivo de las hembras (con genes mitocondriales) se obtuvo un rango aproximado entre 583.877 y 966.554 hembras. El tamaño efectivo calculado para el gen nuclear se encuentra entre 3'473.856 y 5'752.164 individuos.

Para la red de haplotipos del gen 12S se obtuvo un total de 31 haplotipos, dos de estos compartidos por las especies *D. molitor* y *D. luddeckei*. Los haplotipos restringidos a la especie *D. luddeckei* se diferencian de los haplotipos obtenidos para *D. molitor* en dos o tres pasos mutacionales, lo cual es menor incluso a la gran variación al interior de *D. molitor* (figura 6.a). Consistente a este resultado, la red para COI (figura 6.b) evidencia solo un haplotipo compartido entre las dos especies y pocos cambios nucleotídicos entre los individuos tanto de *D. molitor* como de *D. luddeckei*, en comparación al número de pasos mutacionales observados para las especies más lejanas *D. minutus* y *D. cachimbo*. Finalmente, las redes obtenidas para el gen 16S y (figura 6.c) POMC (figura 6.d) evidencian que la gran mayoría de individuos de *D. luddeckei* comparten un mismo haplotipo con los individuos de *D. molitor*. No obstante, también se comparten haplotipos con otras especies como *D. meridensis* y *D. minutus*. La prueba de aislamiento por distancia indica la existencia de este fenómeno en la población ( $R^2 = 0.5806438$ , valor-p = 0.002).

### ***Análisis morfométricos***

No se encontraron diferencias morfológicas entre las unidades taxonómicas *Dendropsophus molitor* y *Dendropsophus luddeckei*. En el análisis de PCA los primeros dos componentes, que corresponden a las variables SVL y TL, explicaron el mayor porcentaje de la variación obtenida (49.5% y 11.8%, respectivamente). Se evidenció que los machos de la especie *D. luddeckei* conforman una agrupación al interior de la distribución obtenida para los machos de la especie *D. molitor* según las componentes extraídas (figura 7.a). Así mismo, para el Análisis Discriminante de Componentes Principales se obtuvo un solapamiento de las agrupaciones de ambas especies en el espacio morfológico determinado por la función discriminante (figura 7.b). Finalmente, el resultado global del MANOVA evidencia una diferenciación significativa entre grupos ( $p = 1.036e-07$ ) al igual que el segundo componente extraído ( $F = 6.9621$ ,  $p = 0.01096$ ). No obstante, para el primer componente extraído (SVL) y de mayor explicación de la varianza no se obtiene una diferenciación significativa entre especies ( $F = 1.8497$ ,  $p = 0.1797$ ).

### ***Análisis de polimorfismos de color***

Respecto al análisis de la coloración en ambas especies se encontró que los SNPs presentes en la región amplificada del gen MC1R no se correlacionan con los polimorfismos de color en los individuos. Se obtuvo un fragmento de 557pb para la región amplificada del gen, en la cual se evidenció solo un cambio consistente (C134G) en 6 individuos representantes de los tres morfotipos definidos (marrón sólido, verde sólido o variegado). Adicionalmente, las mutaciones  $\Delta 433$  y C432A encontradas por Posso-Terranova *et al.* (2017) que son causantes de fenotipos más oscuros en dendrobátidos no corresponden a los cambios nucleotídicos identificados en este estudio (figura 8).

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Uno de los grandes problemas de la taxonomía recae en determinar cuando los linajes sufren un proceso de divergencia y cuando se han separado completamente (Vences & Wake, 2007). Así mismo, existen taxa que son particularmente problemáticos para definir los límites entre linajes. Rivera-Correa & Gutiérrez-Cárdenas (2012) afirman que las especies de alta montaña del género *Dendropsophus* constituyen un grupo taxonómico problemático entre los anuros neotropicales. Esta complejidad es debida a dos factores: (1) la dificultad en la delimitación de

especies debido a la extensa variación intraespecífica, límites entre especies pobremente definidos, pequeños tamaños muestrales y pocos caracteres estudiados para describir originalmente las especies; y (2) no existe un conocimiento concreto de las relaciones filogenéticas entre las especies, a pesar de que existen varios estudios sobre sistemática de los grupos de este género.

*D. luddeckei* es una especie descrita recientemente para el género *Dendropsophus*. Sin embargo, el uso de un muestreo limitado a la distribución de esta especie (y su especie hermana *D. molitor*) junto con un uso limitado de marcadores moleculares en los análisis genéticos realizados por Guarnizo *et al.* (2012), repercute posiblemente en una inadecuada delimitación de las especies. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que, a pesar de las diferencias genéticas y señales acústicas que la caracterizan, *D. luddeckei* no constituye una especie diferente a *D. molitor*. También, es interesante mencionar que los análisis filogenéticos y de delimitación de especies realizados demostraron que la diferenciación existente entre *D. meridensis*, *D. pelidna* y *D. molitor* es muy reducida y el clado que constituyen estas especies es poco soportado.

En primer lugar, las topologías obtenidas para los genes 12S-16S y COI recuperaron el clado Norte (que corresponde a la especie *D. luddeckei*) y clado Sur (que corresponde a la especie *D. molitor*) obtenidos por Guarnizo *et al.* (2009, 2012). No obstante, la diferencia entre dichos clados es insignificante (sobre todo para el gen POMC), pues existe una mayor diferenciación entre individuos de un mismo clado que entre clados. Este patrón también es evidente en las redes de haplotipos y es consistente al observado previamente para genes mitocondriales en otras especies de anfibios (Vences *et al.*, 2005), donde se ha demostrado que altos valores de divergencia dentro de una misma especie son debidos a la gran variabilidad general de los genes mitocondriales. En segundo lugar, el test de delimitación de especies iBPP indica una baja probabilidad que ambos clados (Norte y Sur) constituyan especies separadas en comparación a otras especies altamente soportadas del género, cuyas distancias genéticas entre pares (anexo 8) son en todos los casos superiores al 3% de diferencia obtenido entre *D. molitor* y *D. luddeckei*. Así mismo, Vences *et al.* (2005) han sugerido un umbral de divergencia tentativo para diferenciar especies de anfibios por barcoding. Los valores de divergencia deberían ser aproximadamente  $> 5\%$  para 16S (posiblemente para 12S) y  $> 10\%$  para COI. En consecuencia, los valores calculados para *D. molitor* y *D. luddeckei* (que son menores a dichos umbrales en todos los casos) pueden ser resultado de la gran variación intraespecífica en las poblaciones. El

valor del 3% solo calculado para ADN mitocondrial (12S - 16S) ubica estos linajes más cerca de la “zona gris” de la especiación (Roux *et al.*, 2016) y es muy probable que con un muestreo mayor del genoma este valor se reduzca, evidenciando nuevamente que las poblaciones no son especies diferentes. Adicionalmente, es importante resaltar que los valores de  $F_{st}$  obtenidos en este estudio fueron en todos los casos menores a los reportados por Guarnizo *et al.* (2009) debido posiblemente al incremento en el muestreo, lo que de nuevo sugiere que las poblaciones muestreadas corresponden a una única especie estructurada geográficamente.

En tercer lugar, si bien se observa un patrón de estructuración en las poblaciones muestreadas, los resultados obtenidos en este estudio indican que dicho fenómeno es producto del aislamiento por distancia. Se ha determinado en otras especies de anuros que el aislamiento por distancia constituye el principal proceso que moldea la estructura genética de las poblaciones en un paisaje neotropical (Galarza, 2014). Por consiguiente, la diferenciación obtenida entre los clados Norte y Sur puede ser producto de este proceso (considerando la amplia distribución de *D. molitor* a lo largo de la cordillera) y no implica que los clados constituyan dos especies diferentes. De hecho, el alto tamaño efectivo para los dos marcadores sugiere que la demografía ha tenido poco efecto en la diferenciación de estas poblaciones. Finalmente, la variación que presentan los machos *D. luddeckei* en sus caracteres morfológicos se encuentra contenida en la variación obtenida para los individuos de la especie *D. molitor* en los análisis realizados. Por tanto, no existe una diferenciación morfológica entre ambas especies como también indicó Guarnizo *et al.* (2012) en su estudio. Previamente, se han delimitado especies de anuros neotropicales bajo un patrón de alta divergencia en genes mitocondriales ( $> 9\%$ ) y poca diferenciación morfológica o, al contrario, con baja divergencia genética, pero caracteres morfológicos claramente distinguibles entre especies (Heyer *et al.*, 2005; García-R *et al.*, 2014). El patrón obtenido en este caso evidencia poca diferenciación genética y ausencia de diferencias morfológicas entre las especies, de manera que los clados obtenidos por diferenciación geográfica se ajustan más al escenario de la existencia de una única especie.

Por otro lado, Guarnizo *et al.* (2012) identificaron una diferencia significativa en los rasgos acústicos entre individuos agrupados por especie (ANOVA,  $F = 26.67$ ,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, la validez de los caracteres acústicos en taxonomía ha sido ampliamente discutida por su plasticidad, variabilidad poblacional e individual y su dependencia de factores ambientales (Köhler *et al.*, 2017). Por ejemplo, el número de individuos en la charca, la excitación o dependencia de estaciones reproductivas, carga hormonal de los machos y factores como

temperatura, humedad, etc. influyen las mediciones acústicas (Köhler *et al.*, 2017). Puntualmente, estudios realizados en algunas especies (incluyendo *D. minutus* y *D. ebraccatus*) han demostrado que los individuos altamente motivados incrementan su repertorio vocal y también, modifican los cantos de advertencia y agresividad (aumentando la duración y reduciendo la tasa de repetición de pulsos) en respuesta al incremento en la competitividad acústica (Reichert, 2011; Toledo *et al.*, 2014). Por lo tanto, la determinación de la especie *D. luddeckei* con base a la diferenciación acústica entre clados puede ser complicada debido a múltiples condiciones que pueden afectar los cantos de los individuos. Adicionalmente, para evaluar la existencia de especies se hace necesario cuantificar el grado de aislamiento reproductivo (RI). El único estudio que evalúa RI, precigótico (éxito de fertilización) y postcigótico (viabilidad híbrida de renacuajos), no muestra evidencia de barreras efectivas entre las poblaciones de los clados Norte y Sur (Ulloa, 2003).

Finalmente, los SNPs encontrados en el gen MC1R de la especie *D. molitor* no corresponden a los cambios asociados a una mayor melanización en la especie *Oophaga histrionica*, debido probablemente a un control poligénico de la coloración (Summers *et al.*, 2004). En los anfibios la coloración se encuentra dada por tres tipos de cromatóforos y los pigmentos o estructuras internas que contienen: melanocitos (melanina), iridóforos (cristales de guanina cuya organización al interior de las células produce la coloración) y xanthoforos (pteridinas y carotenoides; Stuckert *et al.*, 2019), de manera que la deposición de una capa sobre la otra proporciona la coloración final del fenotipo (Vitt & Caldwell, 2014). Por esta razón, la coloración verde de *D. molitor* es debida a la superposición de la capa de xanthoforos (pigmentos de coloración amarilla como pteridinas) sobre la capa de iridóforos (coloración azul) y la coloración oscura, debida a los melanocitos.

El rol del gen MC1R en el proceso de pigmentación consiste en estimular la síntesis de eumelanina en los melanocitos (Dessinioti *et al.*, 2011), de forma que la variación en la coloración verdosa característica de *D. molitor* puede ser ocasionada por otros genes implicados en la síntesis de guaninas y pteridinas. Por ejemplo, Stuckert *et al.* (2019) encontraron expresiones diferenciales en un conjunto de genes que controlan la melanogénesis (diferenciación y proliferación en los melanocitos): *tyrp1*, *lef1*, *mitf* y *leol* y en genes asociados con la síntesis de purinas y el desarrollo de iridóforos: *arfgap1*, *arfgap2*, *airc* y *gairt* en la especie *Dendrobates auratus*. Por esta razón, para entender el patrón de coloración de la especie

*D. molitor* se requiere de más estudios que exploren otros genes, no implicados en la melanización como MC1R, que puedan asociarse a la variación en los morfotipos.

En conclusión, con base en los análisis filogenéticos, poblacionales y morfométricos realizados en este estudio, se sugiere que *D. luddeckei* no es una especie independiente y debe considerarse sinónima de *D. molitor*. La evidencia obtenida demuestra que las poblaciones de esta especie presentan una leve diferenciación dada por geografía y concordante con su amplia distribución a lo largo de la cordillera. Así mismo, este estudio resalta la importancia de una profunda revisión taxonómica del grupo *D. molitor* (*D. molitor*, *D. meridensis* y *D. pelidna*) que permita esclarecer las relaciones entre estas especies mediante análisis robustos (datos genéticos y fenotípicos) y mayores tamaños muestrales. Finalmente, esta investigación proporciona un primer acercamiento a las bases genéticas que determinan la coloración de *D. molitor* y enfatiza la importancia de realizar posteriores estudios para comprender los patrones de coloración en esta especie y en otros anuros neotropicales.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el semillero de investigación Genética Evolutiva, Filogeografía y Ecología de Biodiversidad Neotropical de la Universidad del Rosario (IV-ACA008) y la Beca de Investigación “Asociación Colombiana de Biología Evolutiva - COLEVOL”. Agradecemos a Andrea Paz Vélez y Andrew J. Crawford por permitir acceso a los tejidos almacenados en el museo ANDES-A y a Carlos E. Guarnizo por proveer los datos morfométricos de los especímenes no disponibles en su publicación. El muestreo de individuos fue realizado bajo el permiso marco de la Universidad de los Andes #00254.

## REFERENCIAS

1. Arenas-Rodríguez A, Rubiano Vargas JF, Hoyos JM. 2018. Comparative description and ossification patterns of *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863) and *Scinax ruber* (Laurenti, 1758) (Anura: Hylidae). PeerJ 6: e4525.
2. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS *et al.* 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology & Evolution 22(3): 148–155.
3. Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computational Biology 10(4): e1003537.

4. Chenuil A, Cahill A E, Délémontey N, Du Luc E, Fanton H. 2019. Problems and Questions Posed by Cryptic Species. A Framework to Guide Future Studies. In: Casetta E, Da Silva J, Vecchi D, eds. Assessing to Conserving Biodiversity: Conceptual and Practical Challenges. Springer International Publishing, 79-106.
5. Clement M, Snell Q, Walke P, Posada D, Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp 2:184.
6. Crawford AJ. 2003. Relative Rates of Nucleotide Substitution in Frogs. J Mol Evol 57: 636–641
7. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772.
8. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. 2011. Melanocortin 1 Receptor Variants: Functional Role and Pigmentary Associations. Photochemistry and Photobiology 87(5): 978–987.
9. Donnellan S, Adams M, Hutchinson M, Baverstock P. 1993. The identification of cryptic species in the Australian herpetofauna: a high research priority. Herpetology in Australia: 121-126.1.
10. Faivovich J, Haddad C, Garcia P, Frost D, Campbell J, Wheeler W. 2005. Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference to Hylinae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision. Bulletin of the American Museum of Natural History 294: 240.
11. Galarza G. 2014. Importancia de la distancia y el ambiente en la estructura genética de anuros neotropicales. Tesis de Grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
12. Gallina-Tessaro S, López-González C. 2012. Manual de técnicas para el estudio de la fauna. Instituto de Ecología, A.C., Universidad Autónoma de Querétaro, INE–Semarnat. México, D.F.
13. Garcia-R JC, Mendoza ÁM, Ospina O, Cardenas H, Castro F. 2014. A Morphometric and Molecular Approach to Define Three Closely Related Species of Frogs of the Genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from the Cordillera Occidental in Colombia. Journal of Herpetology 48(2): 220–227.
14. Guarnizo CE, Armesto O, Acevedo A. 2014. *Dendropsophus labialis* (Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia) 2(2): 56-6.

15. Guarnizo CE, Amézquita A, Bermingham E. 2009. The relative roles of vicariance versus elevational gradients in the genetic differentiation of the high Andean tree frog, *Dendropsophus labialis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50(1): 84–92.
16. Guarnizo CE, Escallon C, Cannatella D. 2012. Congruence Between Acoustic Traits and Genealogical History Reveals a New Species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) in the High Andes of Colombia. *Herpetologica* 68(4): 523-540.
17. Heyer W, De Sá R, Rettig A. 2005. Sibling species, advertisement calls, and reproductive isolation in frogs of the *Leptodactylus pentadactylus* species cluster (Amphibia, Leptodactylidae). *Herpetologia Petropolitana*: 35-39.
18. Hubbard JK, Uy JAC, Hauber ME, Hoekstra HE, Safran RJ. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics* 26(5): 231–239.
19. Köhler J, Jansen M, Rodríguez A *et al.* 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251.
20. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Hedges SB. 2017. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 34: 1812-1819.
21. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547–1549.
22. Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451–1452.
23. Litvinchuk S, Rozanov YM, Skorinov D. 2004. On cryptic species (from the example of amphibians). *Entomological Review* 84: S75–S98.
24. Nascimento JD, Da Rosa JA, Salgado-Roa FC, Hernández C, Pardo-Díaz C. *et al.* 2019. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. Taquarussuensis* (da Rosa *et al.*, 2017) and *R. Neglectus* (Lent, 1954) the same species? *PLoS One* 14(2): e0211285.
25. Navas CA. 2006. Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: Insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integrative and Comparative Biology* 46(1): 82–91.
26. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2014. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32(1): 268–74.

27. Posso-Terranova A, Andrés J. 2017. Diversification and convergence of aposematic phenotypes: truncated receptors and cellular arrangements mediate rapid evolution of coloration in harlequin poison frogs. *Evolution* 71(11): 2677–2692.
28. Rambaut A. 2014. FigTree v 1.4.1, A Tree Figure Drawing Tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. [11 Diciembre 2019].
29. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G and Suchard MA. 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*: syy032
30. Reichert MS. 2011. Effects of multiple-speaker playbacks on aggressive calling behavior in the treefrog *Dendropsophus ebraccatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65(9): 1739–1751.
31. Rivera-Correa M, Gutiérrez-Cárdenas PDA. 2012. A new highland species of treefrog of the *Dendropsophus columbianus* group (Anura: Hylidae) from the Andes of Colombia. *Zootaxa* 3486: 50-62.
32. Roux C, Fraisse C, Romiguier J, Anciaux Y, Galtier N, Bierne N. 2016. Shedding light on the grey zone of speciation along a continuum of genomic divergence. *PLoS biology* 14(12): e2000234.
33. Ruiz-Carranza P, Ardila-Robayo M, Lynch J. 1996. Lista actualizada de la fauna Amphibia de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 20: 365–415.
34. Simmons JE. 2002 *Herpetological Collecting and Collections Management*, Revised Edition. *Herpetological Circulars* 31: 153. Salt Lake City UT: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
35. Solís-Lemus S, Knowles L, Ané C. 2014. Bayesian species delimitation combining multiple genes and traits in a unified framework. *Evolution* 69(2): 492-507.
36. Stamatakis A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.
37. Struck TH, Feder JL, Bendiksy M, Birkeland S, Cerca J, Gusarov V *et al.* (2018). Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends in Ecology & Evolution* 33(3): 153–163.
38. Stuckert AM, Moore E, Coyle K, Davison I, MacManes M, Roberts R, Summers K. 2019. Variation in pigmentation gene expression is associated with distinct aposematic color morphs in the poison frog *Dendrobates auratus*. *BMC Evolutionary Biology* 19(85).

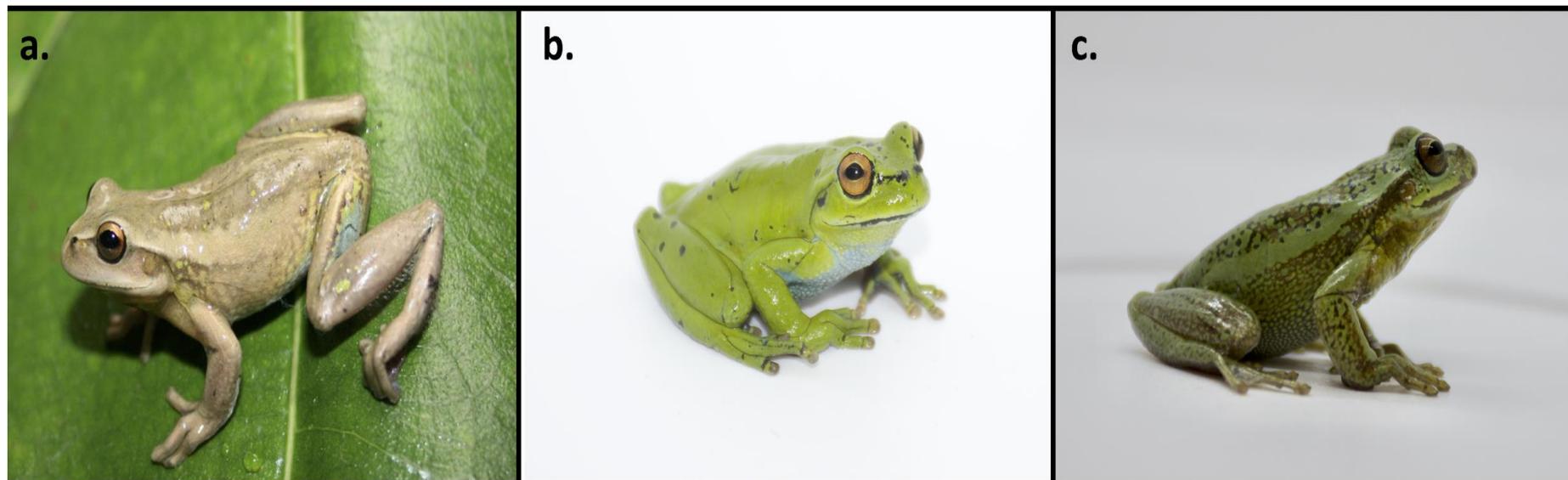
39. Summers K, Cronin TW, Kennedy T. 2004. Crossbreeding of Distinct Color Morphs of the Strawberry Poison Frog (*Dendrobates pumilio*) from the Bocas del Toro Archipelago, Panama. *Journal of Herpetology* 38(1): 1-8.
40. Toledo LF, Martins IA, Bruschi DP, Passos MA, Alexandre C, Haddad CFB. 2014. The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta Ethologica* 18(2): 87–99.
41. Ulloa, C. 2003. Efecto de la distancia geografica sobre el aislamiento reproductivo entre poblaciones de la rana *Hyla labialis* (Anura: Hylidae) Tesis de pregrado. Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia.
42. Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1859–1868.
43. Vences M, Wake DB. 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. *Amphibian Biology. Systematics* 6: 2613–2660.
44. Vestergaard JS, Twomey E, Larsen R, Summers K, Nielsen R. 2015. Number of genes controlling a quantitative trait in a hybrid zone of the aposematic frog *Ranitomeya imitator*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci* 282.
45. Vitt LJ, Caldwell JP. 2014. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles* (4ta ed.) San Diego, USA: Elsevier
46. Watters JL, Cummings ST, Flanagan RL, Siler CD. 2016. Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa* 4072(4): 477–495.
47. Zachos FE. 2014. Taxonomic inflation, the Phylogenetic Species Concept and lineages in the Tree of Life - a cautionary comment on species splitting. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53(2): 180–184.

## TABLAS

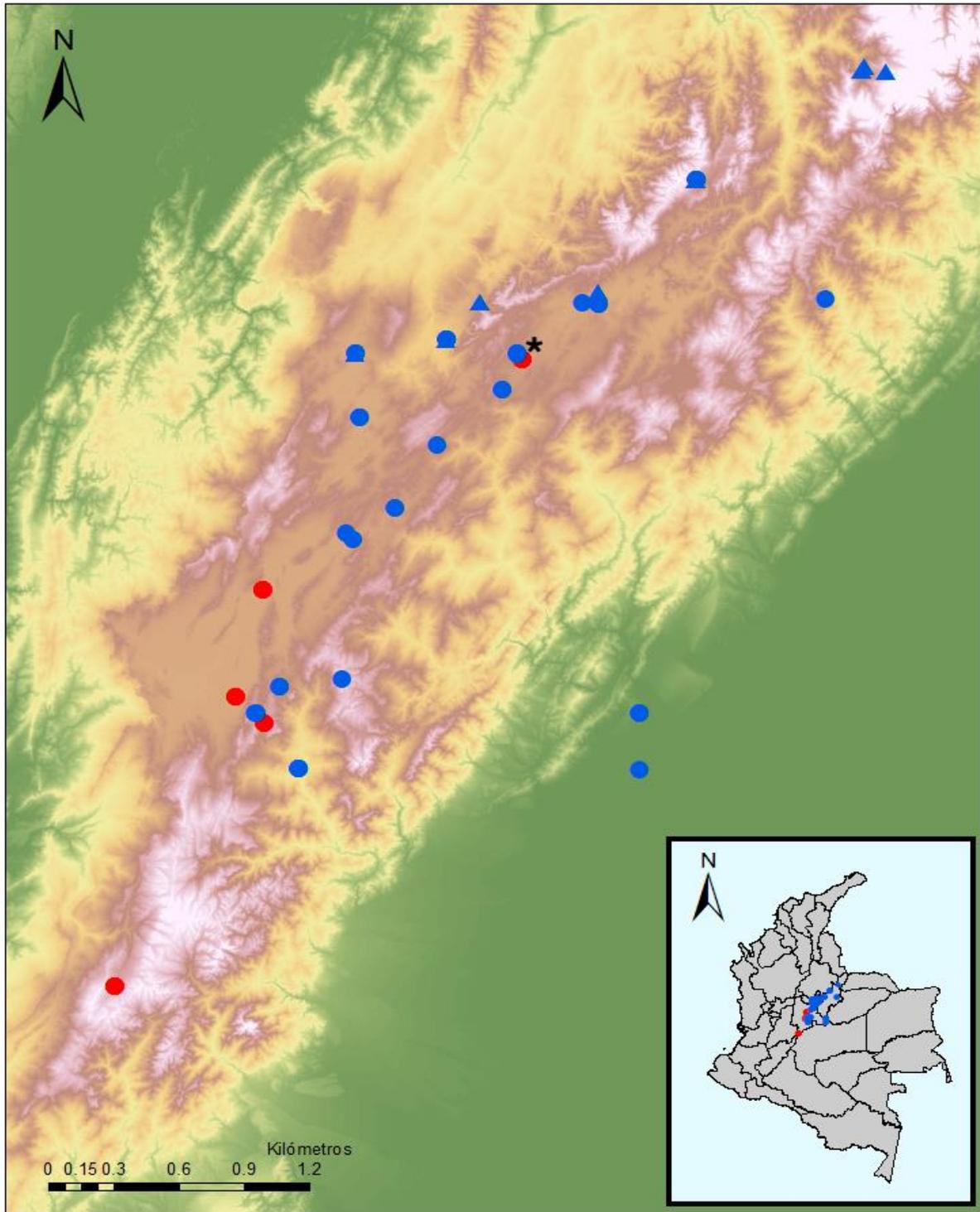
**Tabla 1.** Estadísticas de diversidad y diferenciación genética obtenidas para cada locus y entre especies.

Gen	Fst	Dxy	$\theta$			$\Phi$			Distancia genética	Valor p (Hudson)
			<i>D. molitor</i>	<i>D. luddeckei</i>	Total	<i>D. molitor</i>	<i>D. luddeckei</i>	Total		
<b>12S</b>	0,209	0,013	0,025	0,005	0,025	0,016	0,005	0,014	3%	0,0001
<b>16S</b>	0,199	0,019	0,033	0,011	0,031	0,022	0,008	0,019		0,001
<b>COI</b>	0,537	0,059	0,025	0,038	0,028	0,026	0,028	0,035	4%	0,0001
<b>POMC</b>	0,099	0,006	0,010	0,006	0,010	0,007	0,005	0,007	1%	0,256

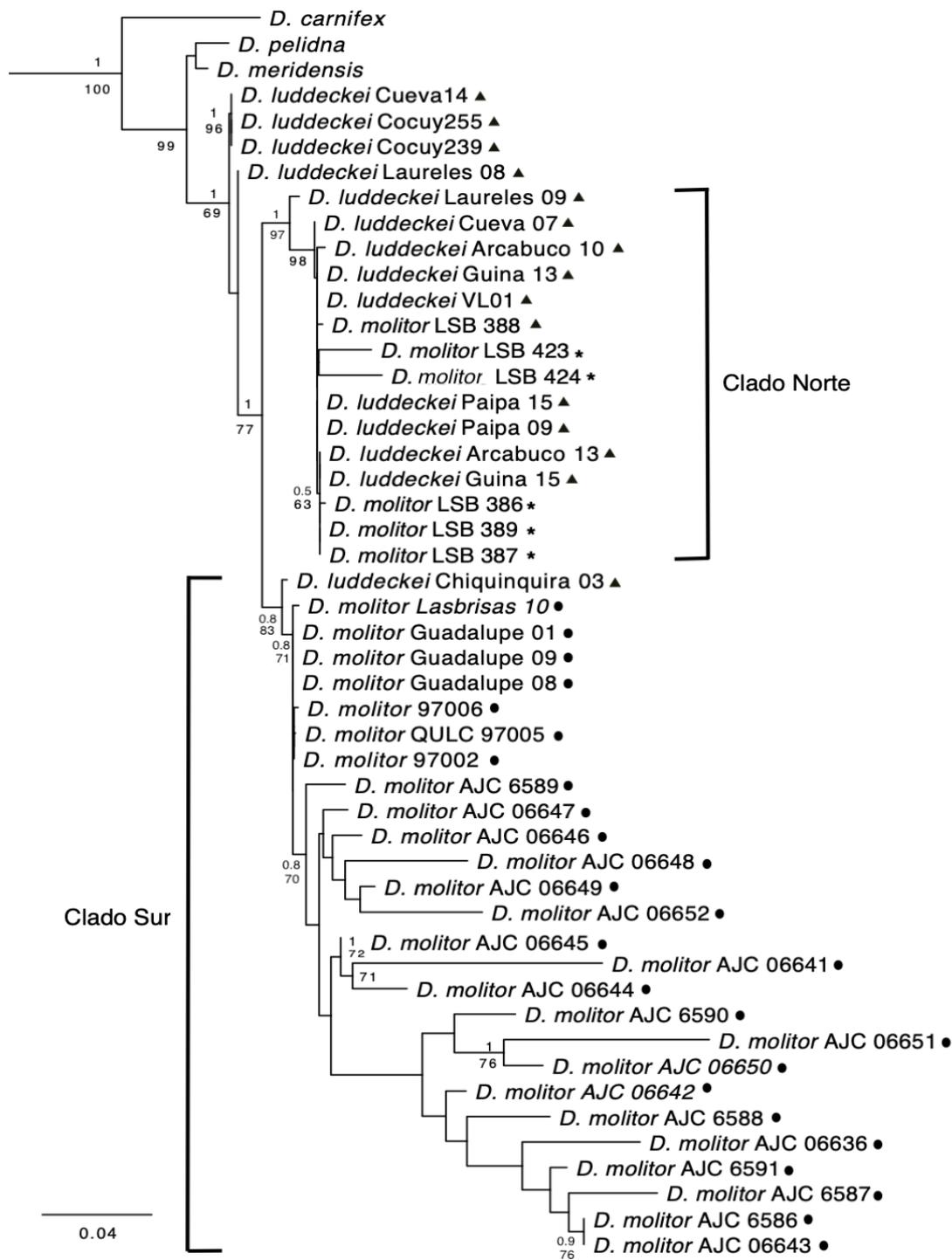
## FIGURAS



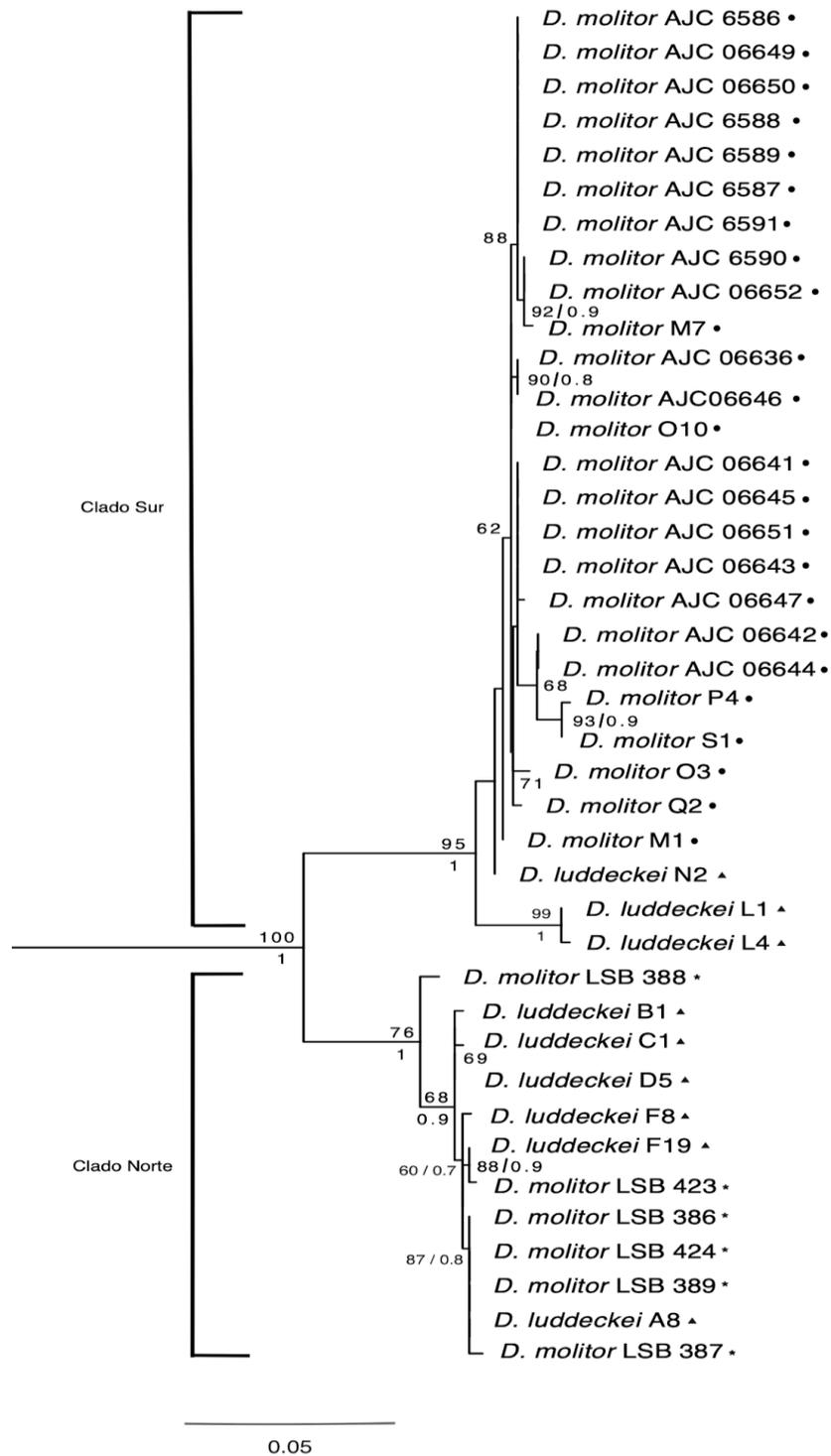
**Figura 1.** Patrones de coloración de la especie *D. molitor* definidos en tres morfotipos. (a) Marrón sólido, (b) verde sólido y (c) variegado. Fotografías (a) por D. Nilsson (<https://cutt.ly/Ure7H0X>), (b) y (c) por L. Barrientos.



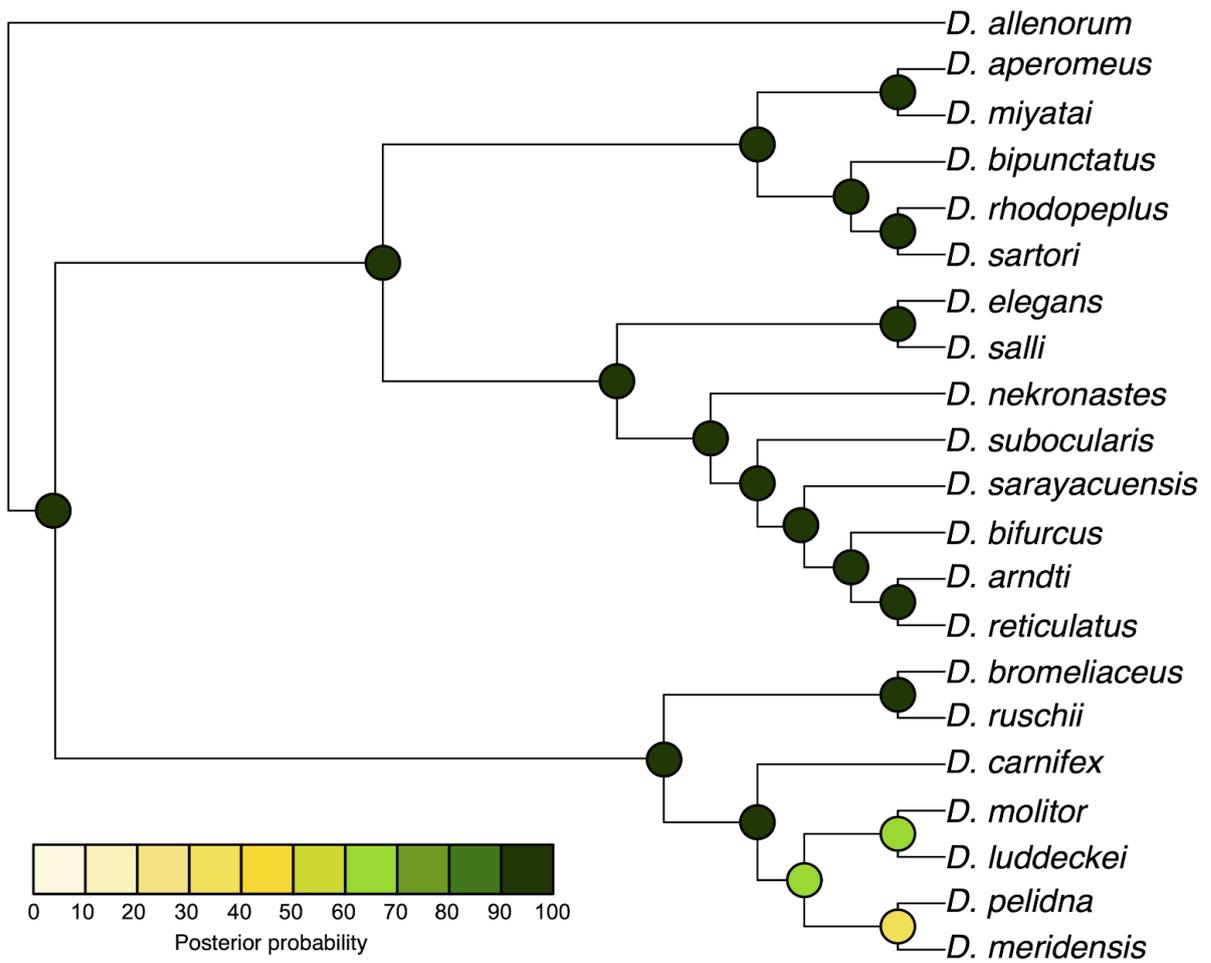
**Figura 2.** Mapa de las localidades de muestreo incluidas en el estudio. Los círculos indican los puntos de muestreo de la especie *D. molitor* y los triángulos indican los puntos de muestreo de la especie *D. luddeckei*. El color rojo en las figuras indica las localidades muestreadas en este estudio y el color azul indica las localidades muestreadas por Guarnizo *et al.* (2009, 2012). El asterisco resalta la localidad muestreada en este estudio que se incluye en el rango de distribución de *D. luddeckei*.



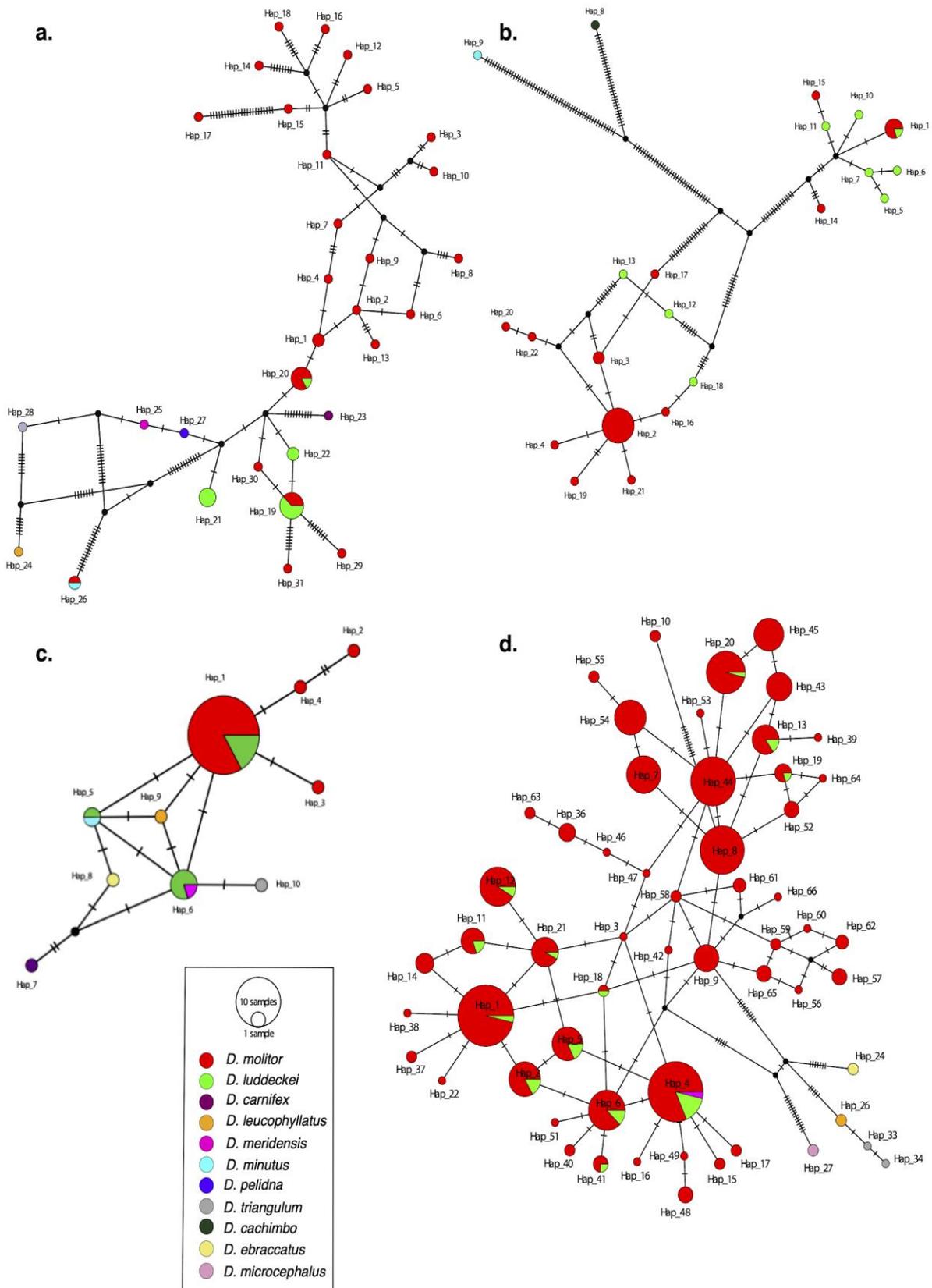
**Figura 3.** Clado obtenido del árbol filogenético construido con ML para los genes 12S y 16S. En cada nodo se indica el soporte (bootstrap) y la probabilidad posterior (BI); los nodos que carecen de valor presentaron un soporte < 50 y los nodos que solo indican el valor de ML no son concordantes con la topología obtenida por BI. Los individuos de la especie *D. molitor* son indicados mediante un círculo, los individuos de la especie *D. luddeckei* mediante un triángulo y los individuos de *D. molitor* colectados en la región norte se indican por un asterisco. El árbol filogenético que incluye todas las especies del género se encuentra en el anexo 3.



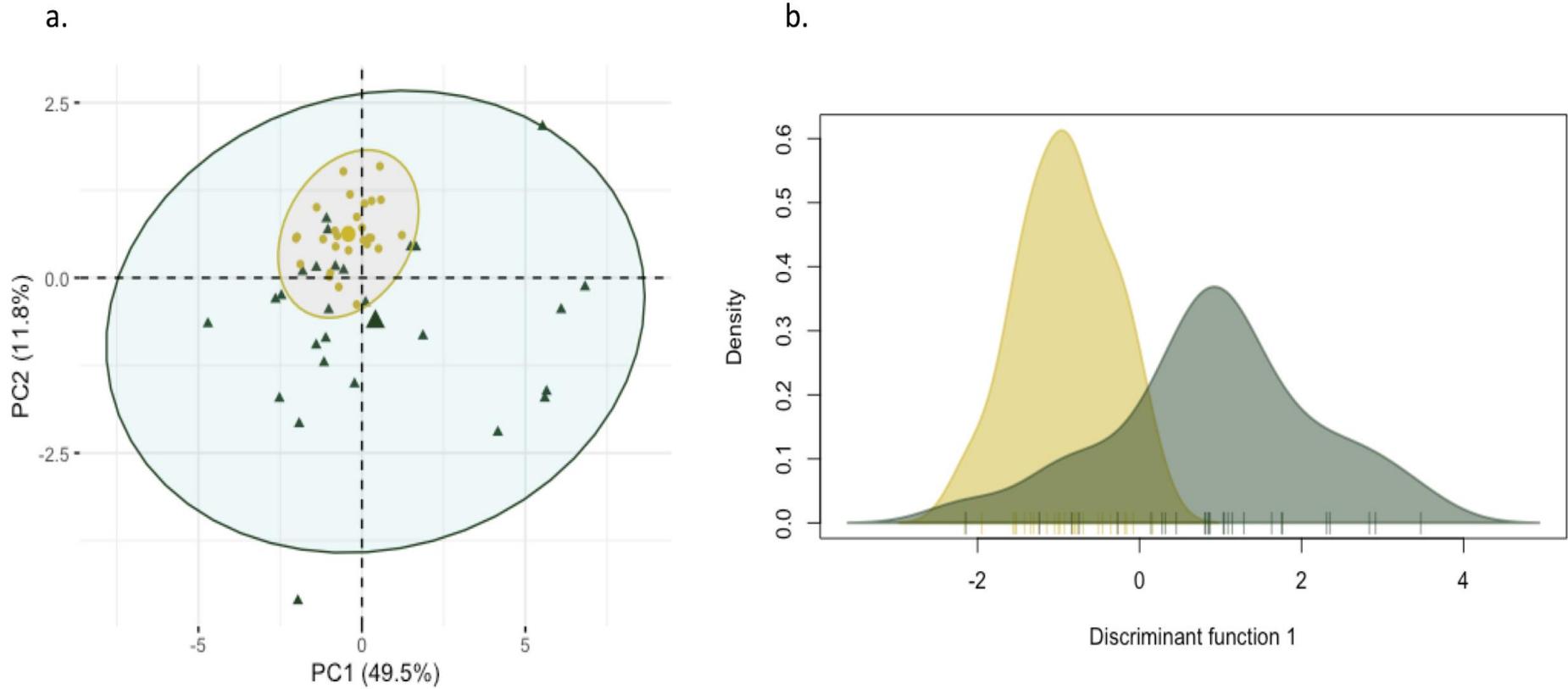
**Figura 4.** Clado obtenido del árbol filogenético construido con ML para el gen COI. En cada nodo se indica el soporte (bootstrap) y la probabilidad posterior (BI); los nodos que carecen de valor presentaron un soporte < 50 y los nodos que solo indican el valor de ML no son concordantes con la topología obtenida por BI. Los individuos de la especie *D. molitor* son indicados mediante un círculo, los individuos de la especie *D. luddeckei* mediante un triángulo y los individuos de *D. molitor* colectados en la región norte se indican por un asterisco. El árbol filogenético que incluye todas las especies del género se encuentra en el anexo 5.



**Figura 5.** Árbol filogenético obtenido del análisis bayesiano para delimitación de especies (iBPP). En cada nodo se muestra la probabilidad posterior según el código de color indicado en la escala.



**Figura 6.** Redes de haplotipos. (a) 12S, (b) COI, (c) 16S y (d) POMC. Las líneas en cada rama indican el número de pasos mutacionales entre haplotipos y el tamaño del círculo es proporcional al número de individuos.



**Figura 7.** Variación morfológica entre *D. molitor* y *D. luddeckei*. (a) PCA elaborado con las variables con mayor explicación de la varianza (SVL: 49.5% y TL: 11.8%). Los individuos de *D. luddeckei* están representados por puntos de color amarillo y los individuos *D. molitor* por triángulos color verde. (b) DAPC obtenido para el PC1; la distribución de los individuos *D. luddeckei* se representa en color amarillo y la distribución de *D. molitor* en color verde.

Consensus	400	410	420	430	440	450	460
	GATTGCTGTGGACCGCTACGTTACAATCTTCTAT - GCTTTGAGATACCATAAATATTATAACCCAG						
D. molitor AJC 6586	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6587	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6588	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6590	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6591	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6641	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6642	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6643	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6644	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6645	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6646	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6647	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6648	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6649	.	.	.	.	.	T	.
D. molitor AJC 6650	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6651	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor AJC 6652	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor LSB 386	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor LSB 388	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor LSB 389	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor LSB 423	.	.	.	.	.	.	.
D. molitor LSB 424	.	.	.	.	.	.	.
MF590226.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590225.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590224.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590223.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590222.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590221.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590220.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590219.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590218.1	T	C	G	A	C	.	.
MF590217.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590216.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590215.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590214.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590213.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590212.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590211.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590210.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590209.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590208.1	T	C	G	.	C	.	.
MF590207.1	T	C	G	.	C	.	.



**Figura 8.** SNPs encontrados en el fragmento de MC1R amplificado para *D. molitor* en comparación a los obtenidos por Posso-Terranova & Andrés (2017) en *O. histrionica*. Las posiciones resaltadas en color naranja indican los SNPs  $\Delta 433$  y C432A asociados a fenotipos más oscuros en *O. histrionica*. El color azul resalta esta misma posición del fragmento para *D. molitor*.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla de localidades y coordenadas muestreadas. Los individuos identificados como AJC y LSB corresponden a las localidades añadidas en este estudio.

<b>Especie</b>	<b>ID Individuo</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
<i>Dendropsophus molitor</i>	97002	Chingaza	4,6691	-73,9691
<i>Dendropsophus molitor</i>	97006	Chingaza	4,6691	-73,9691
<i>Dendropsophus molitor</i>	O10	Choconta	5,17111	-73,66805
<i>Dendropsophus molitor</i>	A1	Guina	6,0975	72,87972
<i>Dendropsophus molitor</i>	A18	Guina	6,0975	-72,87944
<i>Dendropsophus molitor</i>	A4	Guina	6,0975	-72,87916
<i>Dendropsophus molitor</i>	A6	Guina	6,0975	-72,87916
<i>Dendropsophus molitor</i>	A8	Guina	6,0975	-72,8791
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06636	Bogotá	3,82416	-74,3966
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06641	Bogotá	3,82423	-74,3961
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06642	Bogotá	3,82423	-74,3961
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06643	Bogotá	3,82421	-74,3964
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06644	Bogotá	3,82416	-74,3966
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06645	Bogotá	3,82416	-74,3966
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06646	Bogotá	3,82416	-74,3966
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06647	Cajicá	4,942222	-74,0105
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06648	Cajicá	4,942222	-74,0105
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06649	Cajicá	4,942222	-74,0105
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06650	Cajicá	4,942222	-74,0105
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06651	Cajicá	4,942222	-74,0105
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 06652	Cajicá	4,942222	-74,0105
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6586	Bogotá	4,565	-74,006
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6587	Bogotá	4,64055556	-74,0822
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6588	Bogotá	4,64055556	-74,0822
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6589	Bogotá	4,64055556	-74,0822
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6590	Bogotá	4,64055556	-74,0822
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6591	Bogotá	4,64055556	-74,0822
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6592	Bogotá	4,565	-74,006
<i>Dendropsophus molitor</i>	AJC 6593	Bogotá	4,565	-74,006
<i>Dendropsophus molitor</i>	B1	Paipa	5,7475	-73,1336
<i>Dendropsophus molitor</i>	B6	Paipa	5,7475	-73,13388
<i>Dendropsophus molitor</i>	B9	Paipa	5,7475	-73,13361
<i>Dendropsophus molitor</i>	C1	Manzano	5,7513	-73,1777
<i>Dendropsophus molitor</i>	D5	Periquera	5,7619	-72,5427
<i>Dendropsophus molitor</i>	E1	Arcabuco	5,60583	-73,34805

<i>Dendropsophus molitor</i>	E10	Arcabuco	5,60861	-73,34861
<i>Dendropsophus molitor</i>	E11	Arcabuco	5,60861	-73,34833
<i>Dendropsophus molitor</i>	E9	Arcabuco	5,60861	-73,34805
<i>Dendropsophus molitor</i>	F10	Villa de Leyva	5,64861	-73,53277
<i>Dendropsophus molitor</i>	F11	Villa de Leyva	5,64861	-73,5325
<i>Dendropsophus molitor</i>	F19	Villa de Leyva	5,6486	-73,5319
<i>Dendropsophus molitor</i>	F3	Villa de Leyva	5,64861	-73,53222
<i>Dendropsophus molitor</i>	F8	Villa de Leyva	5,6486	-73,5319
<i>Dendropsophus molitor</i>	G1	Chiquinquirá	5,60777	-73,77027
<i>Dendropsophus molitor</i>	G2	Chiquinquirá	5,60777	-73,7700
<i>Dendropsophus molitor</i>	G3	Chiquinquirá	5,60777	-73,76972
<i>Dendropsophus molitor</i>	Guadalupe01	Guadalupe	4,5956	-73,0305
<i>Dendropsophus molitor</i>	Guadalupe08	Guadalupe	4,5956	-73,0305
<i>Dendropsophus molitor</i>	Guadalupe09	Guadalupe	4,5956	-73,0305
<i>Dendropsophus molitor</i>	L1	Chorroblanco	5,50416	-73,3888
<i>Dendropsophus molitor</i>	L4	Chorroblanco	5,50416	-73,38861
<i>Dendropsophus molitor</i>	Lasbrisas10	Lasbrisas	4,4329	-73,0305
<i>Dendropsophus molitor</i>	LSB 386	Tunja	5,59055	-73,3338
<i>Dendropsophus molitor</i>	LSB 387	Tunja	5,59055	-73,3338
<i>Dendropsophus molitor</i>	LSB 388	Tunja	5,59055	-73,3338
<i>Dendropsophus molitor</i>	LSB 389	Tunja	5,59055	-73,3338
<i>Dendropsophus molitor</i>	LSB 423	Tunja	5,59055	-73,3338
<i>Dendropsophus molitor</i>	LSB 424	Tunja	5,59055	-73,3338
<i>Dendropsophus molitor</i>	M1	El Roble	5,4269	-73,7600
<i>Dendropsophus molitor</i>	M2	El Roble	5,4269	-73,7600
<i>Dendropsophus molitor</i>	M7	El Roble	5,4269	-73,7600
<i>Dendropsophus molitor</i>	N2	Ventaquemada	5,35083	-73,55638
<i>Dendropsophus molitor</i>	O3	Choconta	5,17111	-73,66805
<i>Dendropsophus molitor</i>	P4	Suesca	5,085	-73,7772
<i>Dendropsophus molitor</i>	Q2	Cucunuba	5,10194	-73,79583
<i>Dendropsophus molitor</i>	QULC 97005	Chingaza	4,4666	-737.333
<i>Dendropsophus molitor</i>	S1	Chingaza	4,6902	-73,8063
<i>Dendropsophus molitor</i>	W12	Guadalupe	4,59555	-74,03083
<i>Dendropsophus molitor</i>	W3	Guadalupe	4,59555	-74,0305
<i>Dendropsophus molitor</i>	X1	Las Brisas	4,43666	-73,92055
<i>Dendropsophus molitor</i>	X15	Las Brisas	4,43666	-73,92027
<i>Dendropsophus molitor</i>	X16	Las Brisas	4,43666	-73,9200
<i>Dendropsophus molitor</i>	X5	Las Brisas	4,43666	-73,91972
<i>Dendropsophus molitor</i>	X8	Las Brisas	4,43666	-73,91944
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Arcabuco10	Arcabuco	5,7539	-73,4445
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Arcabuco13	Arcabuco	5,7539	-73,4445
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Chiquinquira03	Chiquinquirá	5,6077	-73,7697
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cocuy239	Cocuy	6,4054	-72,4466

<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cocuy255	Cocuy	6,4054	-72,4466
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cueva07	Cueva	6,4042	-72,3822
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cueva14	Cueva	6,4042	-72,3822
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Guina09	Guina	6,0978	-72,8794
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Guina13	Guina	6,0978	-72,8794
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Guina15	Guina	6,0978	-72,8794
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Laurele07	Laureles	6,4152	-72,4394
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Laureles08	Laureles	6,4152	-72,4394
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Laureles09	Laureles	6,4152	-72,4394
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Paipa09	Paipa	5,7818	-73,1338
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Paipa15	Paipa	5,7818	-73,1338
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	VL01	Villa de Leyva	5,6487	-73,5322

**Anexo 2.** Tabla con los números de acceso de todas las secuencias descargadas de la base de datos NCBI.

Especie	ID Individuo	Número de Acceso				
		12S	16S	COI	POMC	MC1R
<i>Dendropsophus molitor</i>	Guadalupe08	JF422603	JF422603		JF422621	
<i>Dendropsophus molitor</i>	Guadalupe01	JF422602	JF422602		JF422620	
<i>Dendropsophus molitor</i>	Guadalupe09	JF422601	JF422601			
<i>Dendropsophus molitor</i>	Lasbrisas10	JF422600	JF422600		JF422618	
<i>Dendropsophus molitor</i>	H. labialis-97006	AF308084	AF308119			
<i>Dendropsophus molitor</i>	H. labialis-97002		AF308118			
<i>Dendropsophus molitor</i>	QULC 97005	AY843635	AY843635			
<i>Dendropsophus molitor</i>	C1			EF653839		
<i>Dendropsophus molitor</i>	M7			EF653838		
<i>Dendropsophus molitor</i>	M2			EU119417		
<i>Dendropsophus molitor</i>	M1			EF653836		
<i>Dendropsophus molitor</i>	D5			EF653835		
<i>Dendropsophus molitor</i>	B1			EF653834		
<i>Dendropsophus molitor</i>	P4			EF653833		
<i>Dendropsophus molitor</i>	A8			EF653832		
<i>Dendropsophus molitor</i>	S1			EF653831		
<i>Dendropsophus molitor</i>	F8			EF653830	FJ204232	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F19			EF653829		
<i>Dendropsophus molitor</i>	L4			EF653828		
<i>Dendropsophus molitor</i>	L1			EF653827		
<i>Dendropsophus molitor</i>	E1			EF653826		
<i>Dendropsophus molitor</i>	N2			EF653825		
<i>Dendropsophus molitor</i>	O3			EF653824		

<i>Dendropsophus molitor</i>	O10			EF653823		
<i>Dendropsophus molitor</i>	Q2			EF653822		
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Chiquinquira03	JF422599	JF422599		JF422617	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Paipa09	JF422598	JF422598		JF422616	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Guina15	JF422597	JF422597		JF422615	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Paipa15	JF422596	JF422596		JF422614	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Arcabuco13	JF422595	JF422595		JF422613	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	VL01	JF422594	JF422594		JF422612	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Guina13	JF422593	JF422593		JF422611	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Arcabuco10	JF422592	JF422592		JF422610	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cueva07	JF422591	JF422591		JF422609	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Laureles09	JF422590	JF422590			
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Guina09				JF422619	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cocuy239	JF422588	JF422588		JF422606	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cocuy255	JF422589	JF422589		JF422607	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Laureles08	JF422586	JF422586		JF422604	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Cueva14	JF422587	JF422587		JF422605	
<i>Dendropsophus luddeckei</i>	Laurele07				JF422608	
<i>Dendropsophus molitor</i>	Z10				EU693076	
<i>Dendropsophus molitor</i>	Y9				EU693075	
<i>Dendropsophus molitor</i>	X9				EU693074	
<i>Dendropsophus molitor</i>	X1				EU693073	
<i>Dendropsophus molitor</i>	W6				EU693072	
<i>Dendropsophus molitor</i>	W13				EU693071	
<i>Dendropsophus molitor</i>	W5				EU693070	
<i>Dendropsophus molitor</i>	W4				EU693069	
<i>Dendropsophus molitor</i>	W2				EU693068	

<i>Dendropsophus molitor</i>	V8				EU693067
<i>Dendropsophus molitor</i>	V7				EU693066
<i>Dendropsophus molitor</i>	V5				EU693065
<i>Dendropsophus molitor</i>	U3				EU693064
<i>Dendropsophus molitor</i>	U2				EU693063
<i>Dendropsophus molitor</i>	U1				EU693062
<i>Dendropsophus molitor</i>	T9				EU693061
<i>Dendropsophus molitor</i>	T8				EU693060
<i>Dendropsophus molitor</i>	T11				EU693059
<i>Dendropsophus molitor</i>	T10				EU693058
<i>Dendropsophus molitor</i>	F3				FJ204231
<i>Dendropsophus molitor</i>	F11				FJ204230
<i>Dendropsophus molitor</i>	F10				FJ204229
<i>Dendropsophus molitor</i>	B9				FJ204228
<i>Dendropsophus molitor</i>	B6				FJ204227
<i>Dendropsophus molitor</i>	X8				FJ204226
<i>Dendropsophus molitor</i>	X5				FJ204225
<i>Dendropsophus molitor</i>	X16				FJ204224
<i>Dendropsophus molitor</i>	X15				FJ204223
<i>Dendropsophus molitor</i>	X10				FJ204222
<i>Dendropsophus molitor</i>	X1				FJ204221
<i>Dendropsophus molitor</i>	A6				FJ204220
<i>Dendropsophus molitor</i>	A4				FJ204219
<i>Dendropsophus molitor</i>	A18				FJ204218
<i>Dendropsophus molitor</i>	A1				FJ204217
<i>Dendropsophus molitor</i>	W3				FJ204216
<i>Dendropsophus molitor</i>	W12				FJ204215

<i>Dendropsophus molitor</i>	G3				FJ204214
<i>Dendropsophus molitor</i>	G2				FJ204213
<i>Dendropsophus molitor</i>	G1				FJ204212
<i>Dendropsophus molitor</i>	E9				FJ204211
<i>Dendropsophus molitor</i>	E11				FJ204210
<i>Dendropsophus molitor</i>	E10				FJ204209
<i>Dendropsophus molitor</i>	G8				JF422584
<i>Dendropsophus molitor</i>	G7				JF422583
<i>Dendropsophus molitor</i>	G6				JF422582
<i>Dendropsophus molitor</i>	G5				JF422581
<i>Dendropsophus molitor</i>	G3				JF422580
<i>Dendropsophus molitor</i>	G2				JF422579
<i>Dendropsophus molitor</i>	G16				JF422578
<i>Dendropsophus molitor</i>	G15				JF422577
<i>Dendropsophus molitor</i>	G14				JF422576
<i>Dendropsophus molitor</i>	G11				JF422575
<i>Dendropsophus molitor</i>	G10				JF422574
<i>Dendropsophus molitor</i>	G01				JF422573
<i>Dendropsophus molitor</i>	I19				JF422572
<i>Dendropsophus molitor</i>	I18				JF422571
<i>Dendropsophus molitor</i>	I17				JF422570
<i>Dendropsophus molitor</i>	I07				JF422569
<i>Dendropsophus molitor</i>	I05				JF422568
<i>Dendropsophus molitor</i>	J20				JF422567
<i>Dendropsophus molitor</i>	J19				JF422566
<i>Dendropsophus molitor</i>	J18				JF422565
<i>Dendropsophus molitor</i>	J17				JF422564

<i>Dendropsophus molitor</i>	J16				JF422563
<i>Dendropsophus molitor</i>	J13				JF422562
<i>Dendropsophus molitor</i>	J12				JF422561
<i>Dendropsophus molitor</i>	J09				JF422560
<i>Dendropsophus molitor</i>	J07				JF422559
<i>Dendropsophus molitor</i>	J05				JF422558
<i>Dendropsophus molitor</i>	J04				JF422557
<i>Dendropsophus molitor</i>	J03				JF422556
<i>Dendropsophus molitor</i>	E9				JF422555
<i>Dendropsophus molitor</i>	E7				JF422554
<i>Dendropsophus molitor</i>	E6				JF422553
<i>Dendropsophus molitor</i>	E21				JF422552
<i>Dendropsophus molitor</i>	E20				JF422551
<i>Dendropsophus molitor</i>	E18				JF422550
<i>Dendropsophus molitor</i>	E17				JF422549
<i>Dendropsophus molitor</i>	E16				JF422548
<i>Dendropsophus molitor</i>	E15				JF422547
<i>Dendropsophus molitor</i>	E14				JF422546
<i>Dendropsophus molitor</i>	E13				JF422545
<i>Dendropsophus molitor</i>	E12				JF422544
<i>Dendropsophus molitor</i>	E11				JF422543
<i>Dendropsophus molitor</i>	E10				JF422542
<i>Dendropsophus molitor</i>	E08				JF422541
<i>Dendropsophus molitor</i>	E05				JF422540
<i>Dendropsophus molitor</i>	E04				JF422539
<i>Dendropsophus molitor</i>	E03				JF422538
<i>Dendropsophus molitor</i>	E01				JF422537

<i>Dendropsophus molitor</i>	B16				JF422537
<i>Dendropsophus molitor</i>	B15				JF422535
<i>Dendropsophus molitor</i>	B14				JF422534
<i>Dendropsophus molitor</i>	B13				JF422533
<i>Dendropsophus molitor</i>	B12				JF422532
<i>Dendropsophus molitor</i>	B11				JF422531
<i>Dendropsophus molitor</i>	B08				JF422530
<i>Dendropsophus molitor</i>	B07				JF422529
<i>Dendropsophus molitor</i>	B04				JF422528
<i>Dendropsophus molitor</i>	B03				JF422527
<i>Dendropsophus molitor</i>	B02				JF422526
<i>Dendropsophus molitor</i>	B01				JF422525
<i>Dendropsophus molitor</i>	L9				JF422524
<i>Dendropsophus molitor</i>	L8				JF422523
<i>Dendropsophus molitor</i>	L7				JF422522
<i>Dendropsophus molitor</i>	L6				JF422521
<i>Dendropsophus molitor</i>	L5				JF422520
<i>Dendropsophus molitor</i>	L20				JF422517
<i>Dendropsophus molitor</i>	L2				JF422516
<i>Dendropsophus molitor</i>	L17				JF422515
<i>Dendropsophus molitor</i>	L16				JF422514
<i>Dendropsophus molitor</i>	L15				JF422513
<i>Dendropsophus molitor</i>	L13				JF422512
<i>Dendropsophus molitor</i>	L12				JF422511
<i>Dendropsophus molitor</i>	L11				JF422510
<i>Dendropsophus molitor</i>	L10				JF422509
<i>Dendropsophus molitor</i>	L1				JF422508

<i>Dendropsophus molitor</i>	D6				JF422507
<i>Dendropsophus molitor</i>	D5				JF422506
<i>Dendropsophus molitor</i>	D4				JF422505
<i>Dendropsophus molitor</i>	D2				JF422504
<i>Dendropsophus molitor</i>	D19				JF422503
<i>Dendropsophus molitor</i>	D18				JF422502
<i>Dendropsophus molitor</i>	D17				JF422501
<i>Dendropsophus molitor</i>	D16				JF422500
<i>Dendropsophus molitor</i>	D15				JF422499
<i>Dendropsophus molitor</i>	D14				JF422498
<i>Dendropsophus molitor</i>	D13				JF422497
<i>Dendropsophus molitor</i>	D12				JF422496
<i>Dendropsophus molitor</i>	D1				JF422495
<i>Dendropsophus molitor</i>	D09				JF422494
<i>Dendropsophus molitor</i>	D06				JF422493
<i>Dendropsophus molitor</i>	D03				JF422492
<i>Dendropsophus molitor</i>	KI9				JF422491
<i>Dendropsophus molitor</i>	K8				JF422490
<i>Dendropsophus molitor</i>	K7				JF422489
<i>Dendropsophus molitor</i>	K6				JF422488
<i>Dendropsophus molitor</i>	K5				JF422487
<i>Dendropsophus molitor</i>	K3				JF422486
<i>Dendropsophus molitor</i>	K2				JF422485
<i>Dendropsophus molitor</i>	K19				JF422484
<i>Dendropsophus molitor</i>	K18				JF422483
<i>Dendropsophus molitor</i>	K17				JF422482
<i>Dendropsophus molitor</i>	K16				JF422481

<i>Dendropsophus molitor</i>	K15				JF422480
<i>Dendropsophus molitor</i>	K14				JF422479
<i>Dendropsophus molitor</i>	K13				JF422478
<i>Dendropsophus molitor</i>	K12				JF422477
<i>Dendropsophus molitor</i>	K11				JF422476
<i>Dendropsophus molitor</i>	K10				JF422475
<i>Dendropsophus molitor</i>	K1				JF422474
<i>Dendropsophus molitor</i>	A17				JF422473
<i>Dendropsophus molitor</i>	A16				JF422472
<i>Dendropsophus molitor</i>	A15				JF422471
<i>Dendropsophus molitor</i>	A14				JF422470
<i>Dendropsophus molitor</i>	A11				JF422469
<i>Dendropsophus molitor</i>	A10				JF422468
<i>Dendropsophus molitor</i>	A09				JF422467
<i>Dendropsophus molitor</i>	A08				JF422466
<i>Dendropsophus molitor</i>	A09				JF422465
<i>Dendropsophus molitor</i>	A05				JF422464
<i>Dendropsophus molitor</i>	A03				JF422463
<i>Dendropsophus molitor</i>	C250				JF422462
<i>Dendropsophus molitor</i>	C255				JF422461
<i>Dendropsophus molitor</i>	C253				JF422460
<i>Dendropsophus molitor</i>	C252				JF422459
<i>Dendropsophus molitor</i>	C251				JF422458
<i>Dendropsophus molitor</i>	C248				JF422457
<i>Dendropsophus molitor</i>	C247				JF422457
<i>Dendropsophus molitor</i>	C244				JF422455
<i>Dendropsophus molitor</i>	C239				JF422454

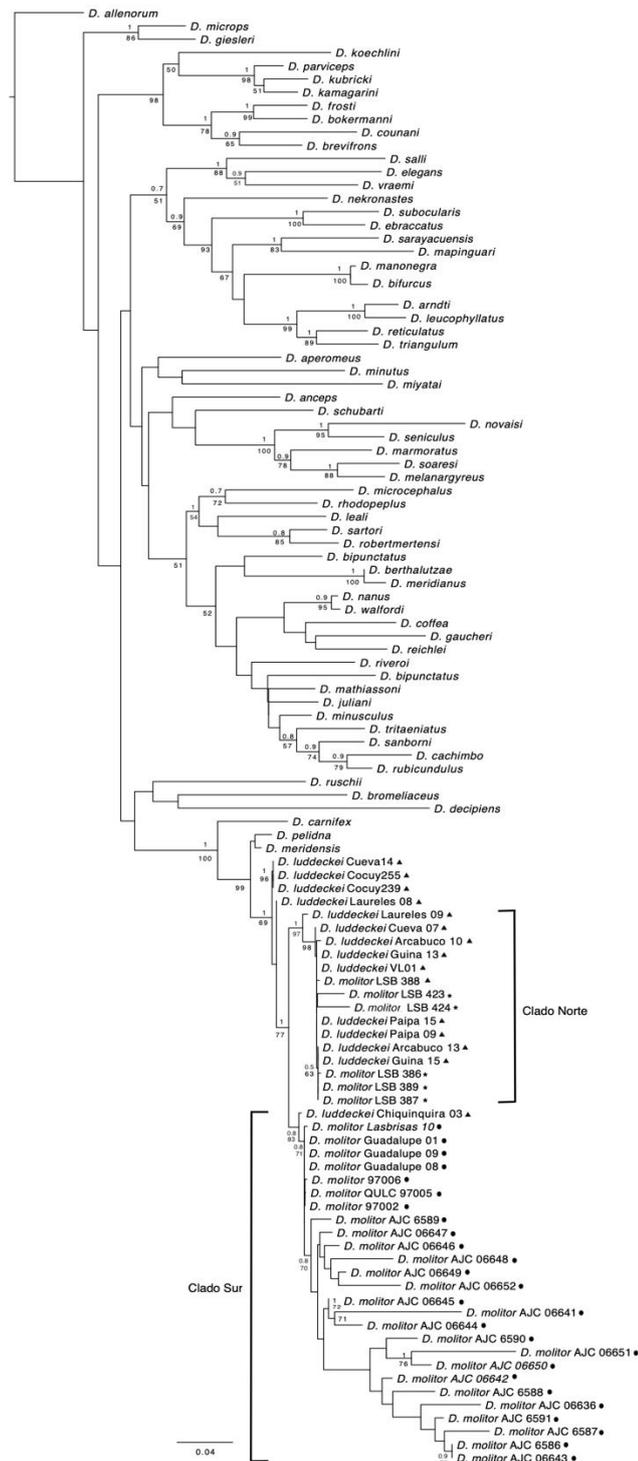
<i>Dendropsophus molitor</i>	H5				JF422453
<i>Dendropsophus molitor</i>	H4				JF422452
<i>Dendropsophus molitor</i>	H3				JF422451
<i>Dendropsophus molitor</i>	H2				JF422450
<i>Dendropsophus molitor</i>	H17				JF422449
<i>Dendropsophus molitor</i>	H16				JF422448
<i>Dendropsophus molitor</i>	H13				JF422447
<i>Dendropsophus molitor</i>	H12				JF422446
<i>Dendropsophus molitor</i>	H1				JF422445
<i>Dendropsophus molitor</i>	H08				JF422444
<i>Dendropsophus molitor</i>	H06				JF422443
<i>Dendropsophus molitor</i>	H15				JF422442
<i>Dendropsophus molitor</i>	H14				JF422441
<i>Dendropsophus molitor</i>	H11				JF422440
<i>Dendropsophus molitor</i>	H10				JF422439
<i>Dendropsophus molitor</i>	H09				JF422438
<i>Dendropsophus molitor</i>	F9				JF422437
<i>Dendropsophus molitor</i>	F8				JF422436
<i>Dendropsophus molitor</i>	F7				JF422435
<i>Dendropsophus molitor</i>	F21				JF422434
<i>Dendropsophus molitor</i>	F20				JF422433
<i>Dendropsophus molitor</i>	F19				JF422432
<i>Dendropsophus molitor</i>	F18				JF422431
<i>Dendropsophus molitor</i>	F17				JF422430
<i>Dendropsophus molitor</i>	F16				JF422429
<i>Dendropsophus molitor</i>	F15				JF422428
<i>Dendropsophus molitor</i>	F14				JF422427

<i>Dendropsophus molitor</i>	F13				JF422426	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F12				JF422425	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F11				JF422424	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F10				JF422423	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F06				JF422422	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F04				JF422421	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F03				JF422420	
<i>Dendropsophus molitor</i>	F02				JF422419	
<i>Dendropsophus allenorum</i>	KU 215190	DQ380348				
<i>Dendropsophus anceps</i>	CFBH 5797	AY843597	AY843597			
<i>Dendropsophus aperomeus</i>	KU 212083	AY819450	AY819549			
<i>Dendropsophus arndti</i>	SMF88391; SMF88383	KY406348	KY406351		KY406692	
<i>Dendropsophus berthaltutzae</i>	CFBH 5418	AY843607	AY843607			
<i>Dendropsophus bifurcus</i>	QCAZA37198	KY406298	KY406449			
<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	MRT5946	AY843608	AY843608			
<i>Dendropsophus bokermanni</i>	TG2632/4016	KT721835	KT721792			
<i>Dendropsophus brevifrons</i>	QCAZA28273	KY406294	KY406459			
<i>Dendropsophus bromeliaceus</i>	3469_RFB760	KT962844	KT962844			
<i>Dendropsophus carnifex</i>	QCAZA15342	KY406287	KY406454			
<i>Dendropsophus counani</i>	SMNS1212	KT721834	KT721791			
<i>Dendropsophus ebraccatus</i>	QCAZA40847; UTA 51789	KY406303	KY406451		AY819117	
<i>Dendropsophus elegans</i>	CFBH14964	MK266719	MK266719			
<i>Dendropsophus frosti</i>	MNCN:ADN46749	JQ088283	JQ088283			
<i>Dendropsophus gaucheri</i>	62BM	JF973311	JF973303			
<i>Dendropsophus giesleri</i>	CFBH S/N	AY843629	AY843629			
<i>Dendropsophus kamagarini</i>	CORBIDI5246	MG041824	MG041945			
<i>Dendropsophus koechlini</i>	CORBIDI5235; KU 215248	MG041828	MG041950		AY819119	

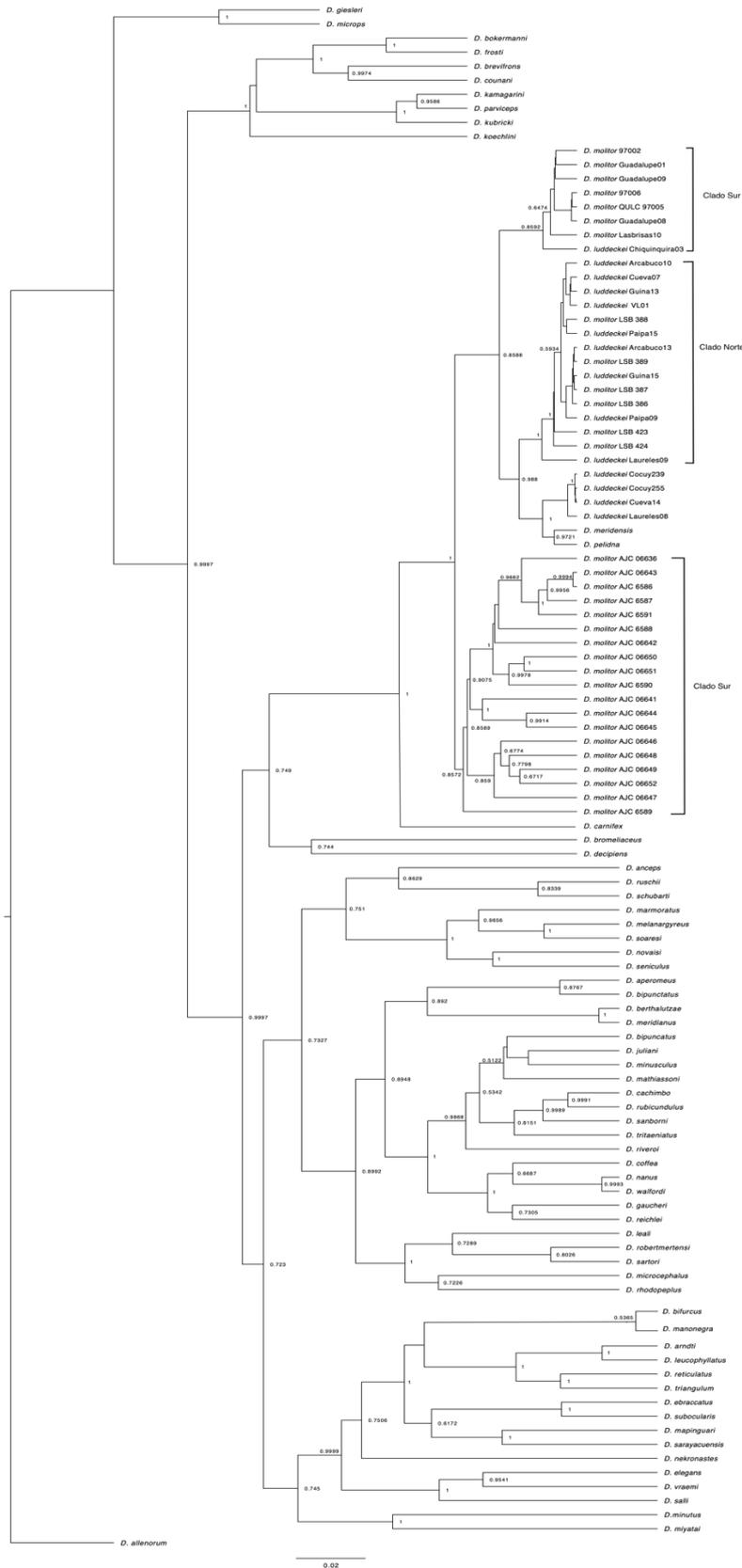
<i>Dendropsophus kubricki</i>	CORBIDI6235	MG041826	MG041947		
<i>Dendropsophus leali</i>	KU 215259	AY819451			
<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	MC297; AF1815	KY406285	KY406373		KY406693
<i>Dendropsophus manonegra</i>	MHUA:A_7336	KF009943	KF009943		
<i>Dendropsophus mapinguari</i>	MPEG 28682	KX018318	KX018318		
<i>Dendropsophus marmoratus</i>	MJH 7116	AY843640	AY843640		
<i>Dendropsophus melanargyreus</i>	47PG	JF973313	JF973305		
<i>Dendropsophus meridensis</i>	<i>Dendropsophus meridensis</i>	JF422585	JF422585		JF422622
<i>Dendropsophus microps</i>	CFBH22025	MK266720	MK266720		
<i>Dendropsophus minutus</i>	CFBH18567	MK266721	MK266721		
<i>Dendropsophus miyatai</i>	JPC 10772	AY843647	AY843647		
<i>Dendropsophus nanus</i>	47bm; 53122	JF973312	JF973304		AY819123
<i>Dendropsophus nekronastes</i>	MZUESC 10177	KY552471	KY552471		
<i>Dendropsophus parviceps</i>	QCAZ39515	MG041821	MG041943		
<i>Dendropsophus pelidna</i>	<i>Dendropsophus pelidna</i>	AY819434			
<i>Dendropsophus reticulatus</i>	QCAZA49338; CORBIDI12252	KY406345	KY406413		KY406700
<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	QCAZA44584	KY406330	KY406466		
<i>Dendropsophus riveroi</i>	KU 217613	DQ380372			
<i>Dendropsophus robertmertensi</i>	MZFC 15824	AY819452	AY819551		
<i>Dendropsophus rubicundulus</i>	IT-H 0653	AY843661	AY843661		
<i>Dendropsophus sallii</i>	<i>Dendropsophus sallii</i>	AY362976	AY362976		
<i>Dendropsophus sanborni</i>	MACN 38638	AY843663	AY843663		
<i>Dendropsophus sarayacuensis</i>	MJH 7143	AY843664	AY843664		
<i>Dendropsophus sartori</i>	MZFC 16014	AY819453	AY819552		
<i>Dendropsophus schubarti</i>	WED 57619	DQ380374			
<i>Dendropsophus seniculus</i>	CFBH 5761	AY843666	AY843666		
<i>Dendropsophus triangulum</i>	WED 54094; QCAZA44457	AY326053	AY326053		KY406707

<i>Dendropsophus vraemi</i>	CORBIDI9613	KY406283	KY406452		KY406709	
<i>Dendropsophus walfordi</i>	MJH 129	AY843683	AY843683			
<i>Dendropsophus cachimbo</i>	MJ1240		JF790049			
<i>Dendropsophus microcephalus</i>	UTA 50632	AY843643	AY843643		AY819121	
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 20					MF590225
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 19					MF590224
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 18					MF590223
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 17					MF590222
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 16					MF590221
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 6					MF590220
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 15					MF590219
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 14					MF590218
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 13					MF590217
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 11					MF590216
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 10					MF590215
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 9					MF590214
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 8					MF590213
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 7					MF590212
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 5					MF590211
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 4					MF590210
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 3					MF590209
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 2					MF590208
<i>Oophaga histrionica</i>	Haplotype 1					MF590207

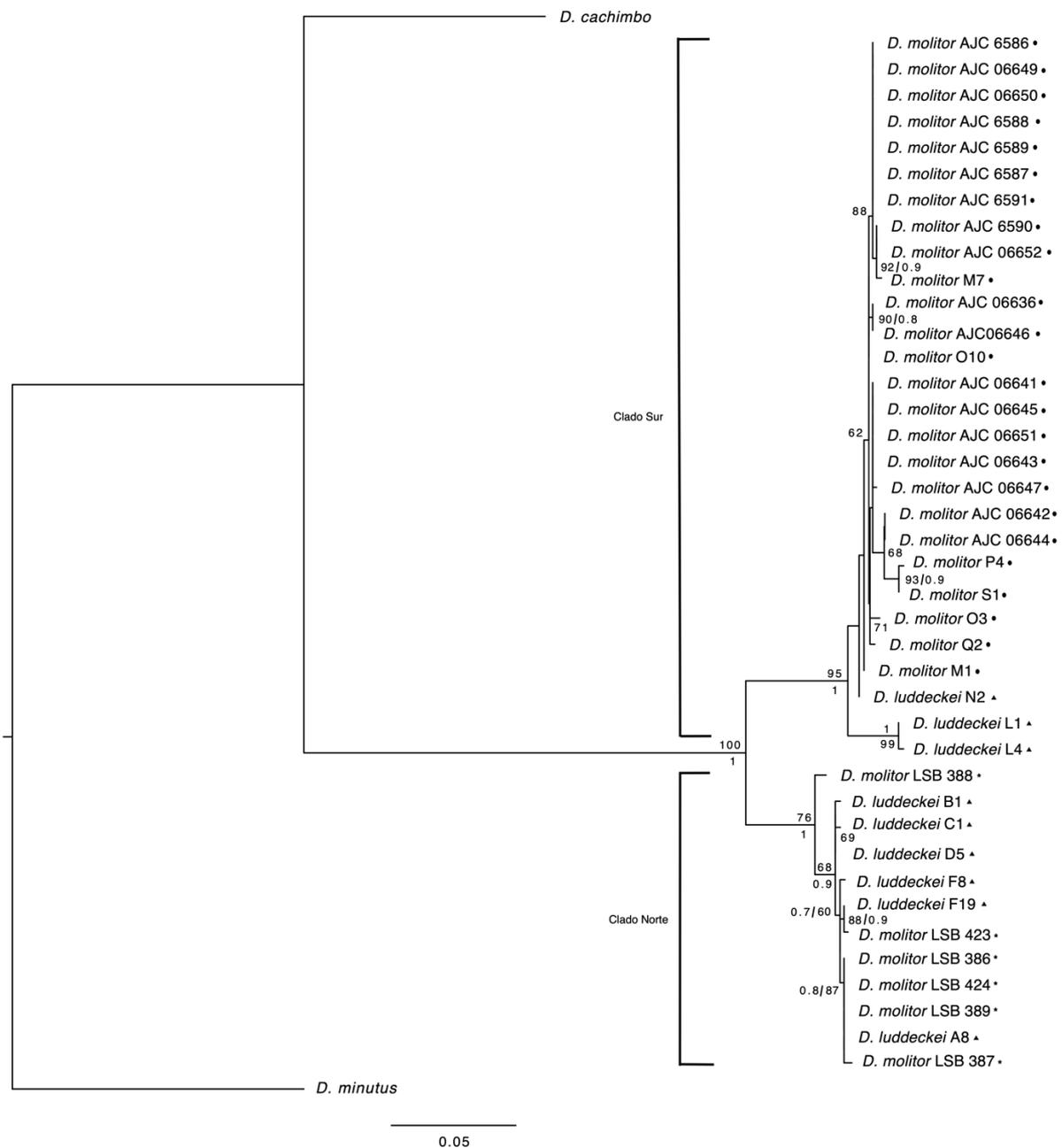
**Anexo 3.** Árbol filogenético del género *Dendropsophus* construido con ML para los genes 12S y 16S. En cada nodo se indica el soporte (bootstrap) y la probabilidad posterior (BI); los nodos que carecen de valor presentaron un soporte < 50 y los nodos que solo indican el valor de ML no son concordantes con la topología obtenida por BI. Los individuos de la especie *D. molitor* son indicados mediante un círculo, los individuos de la especie *D. luddeckei* mediante un triángulo y los individuos de *D. molitor* colectados en la región norte se indican por un asterisco.



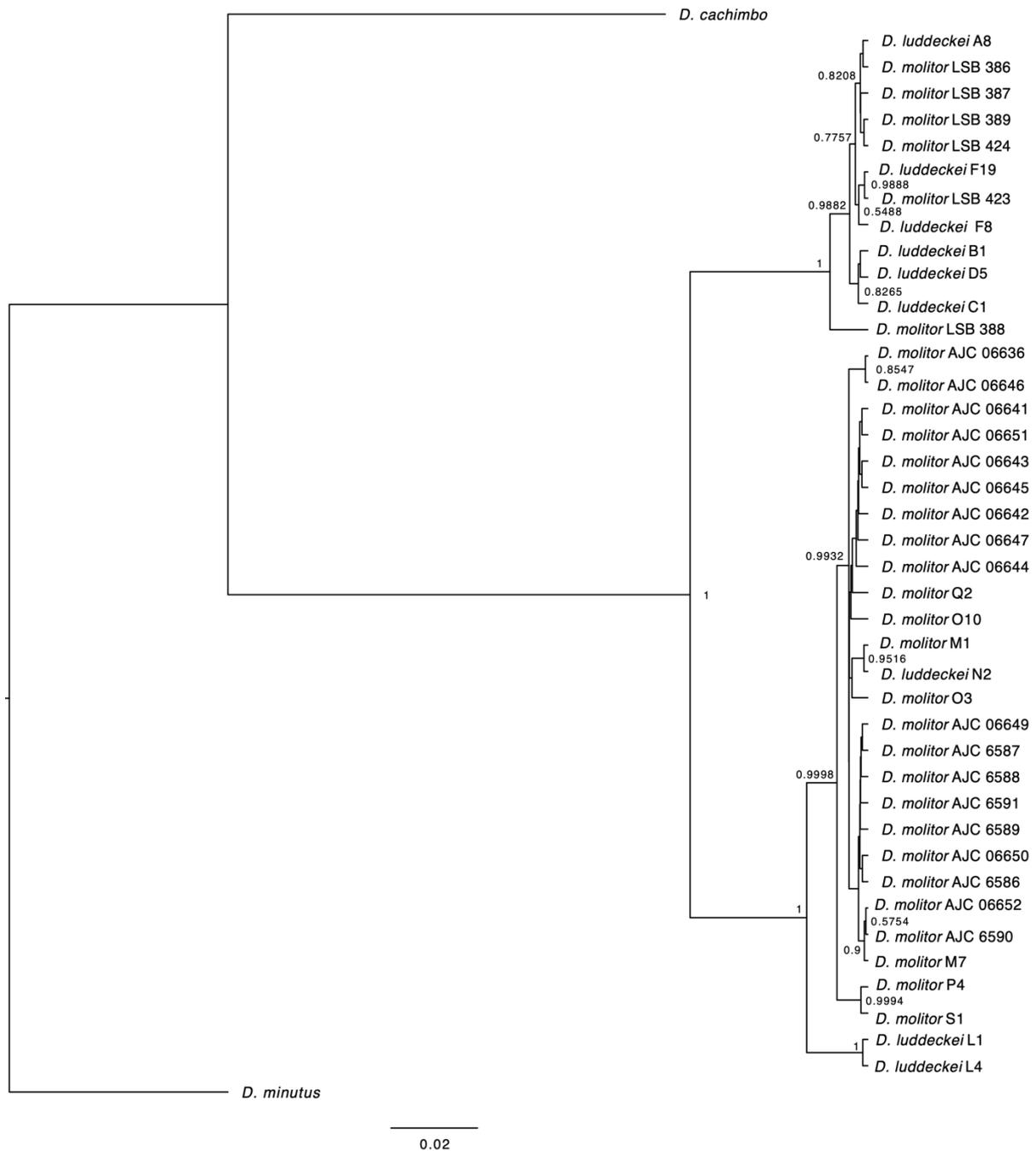
**Anexo 4.** Árbol filogenético del género *Dendropsophus* construido con BI para los genes 12S y 16S. En cada nodo se indica la probabilidad posterior y los nodos que carecen de valor presentaron una probabilidad < 0.5.



**Anexo 5.** Árbol filogenético del género *Dendropsophus* construido con ML para el gen COI. En cada nodo se indica el soporte (bootstrap) y la probabilidad posterior (BI); los nodos que carecen de valor presentaron un soporte < 50 y los nodos que solo indican el valor de ML no son concordantes con la topología obtenida por BI. Los individuos de la especie *D. molitor* son indicados mediante un círculo, los individuos de la especie *D. luddeckei* mediante un triángulo y los individuos de *D. molitor* colectados en la región norte se indican por un asterisco.



**Anexo 6.** Árbol filogenético del género *Dendropsophus* construido con BI para el gen COI. En cada nodo se indica la probabilidad posterior y los nodos que carecen de valor presentaron una probabilidad < 0.5.





**Anexo 8.** Tabla con las distancias genéticas calculadas entre pares de especies del género *Dendropsophus* que presentaron un soporte alto (pp = 100) en el análisis iBPP.

<b>Especies</b>	<b>Distancia genética</b>
<i>D. bromeliaceus</i>	13%
<i>D. ruschii</i>	
<i>D. arndti</i>	7%
<i>D. reticulatus</i>	
<i>D. elegans</i>	10%
<i>D. salli</i>	
<i>D. sartori</i>	8%
<i>D. rodopeplus</i>	
<i>D. aperomeus</i>	13%
<i>D. miyatai</i>	