



Unexpected biogeographical patterns? The case of the apparently widespread *Trachycephalus typhonius* (Anura: Hylidae)

Angela M. Mendoza-Henao¹, Juan Alejandro Guerrero-Cupacan¹, Khristian Venegas-Valencia¹ & Mailyn A. Gonzalez¹

¹Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Centro de Colecciones y Gestión de especies, Avenida Paseo Bolívar No. 16-20, Bogotá, Colombia

Resumen

Los sesgos taxonómicos y espaciales limitan la comprensión de los patrones de biodiversidad, especialmente en el Neotrópico, con consecuencias en la sistemática, la biogeografía y la conservación. Aquí abordamos el impacto de estos sesgos centrándonos en la especie de amplia distribución *Trachycephalus typhonius*. A pesar de su presencia común en toda su área de distribución, las identificaciones erróneas y la diversidad críptica han oscurecido su verdadera historia filogenética y biogeográfica. Mediante un extenso muestreo de campo y el análisis molecular de localidades cis y transandinas, hemos revelado una divergencia genética sustancial dentro de *T. typhonius*, lo que sugiere la presencia de múltiples especies crípticas. Las muestras de Orinoquia (cis-Andinos) y el valle de Magdalena (trans-Andinos) difieren de *T. typhonius sensu stricto* de Guyana, y se observaron al menos tres linajes para *T. typhonius* a lo largo del continente. Nuestros resultados muestran el efecto tanto de los Andes como de la Amazonia-Orinoquia en la estructura filogeográfica y dan una idea de la historia biogeográfica de *T. typhonius sensu lato*. Nuestros resultados demuestran la importancia de abordar los sesgos taxonómicos y espaciales, como la “brecha colombiana”, para evaluar con precisión la biodiversidad e informar las estrategias de conservación. Nuestros hallazgos ilustran la necesidad de muestreos exhaustivos y estudios moleculares para especies “comunes”, con el fin de desentrañar la diversidad oculta relevante para nuestra comprensión de los procesos evolutivos en el Neotrópico.

Palabras clave: Diversidad críptica, Amazonas, filogeografía, sesgos de muestreo

Introducción

Las barreras ecológicas y de comportamiento a la dispersión de especies causan patrones de diferenciación genética de linajes a través del proceso de vicarianza (Guevara-Andino et al. 2024), como resultado de las historias geológicas y climáticas de los últimos millones de años (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez 2013). El impacto de la estructura geográfica tiene un amplio espectro de respuestas en los patrones de dispersión y aislamiento en especies de tierras bajas muy extendidas. La fuerza de la barrera varía con el modo de dispersión y el rango elevacional de las especies (Smith et al. 2014, Salgado-Roa et al. 2024). Por ejemplo, la cordillera de los Andes es una de las barreras más conocidas para la dispersión de especies en el Neotrópico, dividiendo los linajes de tierras bajas en lo que se conoce como biotas cis- y trans-andinas (en relación con el Amazonas) (Gregory-Wodzick 2000, Hoorn et al. 2010). Del mismo modo, los análisis de los anfibios amazónicos revelan profundas divergencias entre varios linajes a pesar de que tienen distribuciones extensas (Rojas et al. 2018, Jaramillo et al. 2020, Vacher et al. 2020). Existe un desafío, por ejemplo, con grupos que exhiben una alta diversidad de especies crípticas cuya distribución e identidad aún no están bien establecidas, al menos con base en su morfología indistinguible (Fouquet 2021).

La comprensión de los patrones de biodiversidad en el Neotrópico se enfrenta a múltiples desafíos, incluyendo el sesgo taxonómico y espacial (Gotelli et al. 2023), conocidos como déficit Linneano y Wallaceano, respectivamente (Whittaker et al. 2005; Riddle et al. 2008; Vasconcelos et al. 2019). En cuanto al déficit Linneano, las especies que rara vez se encuentran en el campo tienden a ser buscadas y, por lo tanto, están sobrerrepresentadas en las colecciones de los museos en relación con su abundancia real (Kruckeberg y Rabinowitz, 1985), mientras que las especies comunes tienden a estar infrarrepresentadas. Las consecuencias de este sesgo pueden ocultar tendencias críticas dentro de complejos de especies que se perciben como comunes (Troudet et al. 2017).

Existe un claro sesgo en la biodiversidad hacia las especies raras, ignorando a las comunes por considerarlas no carismáticas (Magurran y Henderson 2003, Monsarrat y Kerley 2018). Por ejemplo, el caso del complejo *Atelopus ignescens*, abundante en su área de distribución, con cinco especies diferentes ahora reconocidas y posiblemente extintas como *Atelopus pastuso* (Cepeda-Quilindo y Rueda-Almonacid 2005, Coloma et al. 2010, Coloma y Carvajal-Endara 2020). La diversidad críptica se oculta en casos como *Boana platanera* con *B. xerophylla* (Escalona et al. 2021), *Hyalinobatrachium tatayoi* con *H. fleischmanni* (Mendoza-Henao et al. 2020), *Rhinella bella* con *Rhinella marina* (Menéndez-Guerrero et al. 2024), cinco linajes ocultos dentro de *Ischnocnema guentheri* (Gehara et al. 2013), y cuatro linajes ocultos dentro de *Centrolene buckleyi* (Amador et al. 2018, Franco-Mena et al. 2024). La identificación de esos casos aumentaría la diversidad de especies de anfibios en el Neotrópico en al menos un 25 % respecto a la actualmente reconocida (Lyra et al. 2017).

En relación con el déficit de Wallaceano (sesgo espacial), la disponibilidad de información se distribuye de forma desigual en todo el mundo, destacando en particular la falta de datos en los trópicos, ricos en especies (Boitani et al. 2011). Los esfuerzos de muestreo suelen estar sesgados por múltiples barreras que incluyen la ubicación geográfica, la accesibilidad (Oliveira et al. 2016) y la riqueza del país (Amano y Sutherland 2013). Los estudios herpetológicos en Suramérica muestran esta tendencia: usualmente faltan datos de Colombia en estudios de taxonomía y sistemática (Vásquez-Restrepo 2021). Esta falta de representatividad de los datos colombianos, denominada «brecha colombiana», está asociada a la «brecha de datos sobre biodiversidad» en las regiones tropicales (Collen et al. 2008).

El submuestreo actual, la falta de datos genéticos completos, la burocracia, la invisibilidad de los datos, la accesibilidad a los sitios (Vásquez-Restrepo 2021), además de las barreras lingüísticas en la investigación del sur global (Arenas-Castro et al. 2024), aspectos de diversidad, equidad e inclusión (DEI) (Ocampo-Ariza et al. 2023), pueden explicar esta ausencia en el uso de datos colombianos.

Los conocimientos actuales sobre la rana lechosa, *Trachycephalus typhonius* (Anura: Hylidae) ilustran el sesgo taxonómico y espacial con el que se encuentran los anfibios muy extendidos. Según Frost (2024), esta especie de amplia distribución se distribuye en sabanas naturales y en general en tierras bajas desde el nivel del mar hasta los 800 m s.n.m. desde el sur de México hasta el norte de Argentina; y fue descrita por Linneo (1758) basándose en especímenes de Paranamaribo, Surinam (Lavilla et al. 2010). Dada su tolerancia a la transformación humana (La Marca et al. 2010, Castellanos-Durán y Giraldo-Palacio 2022), la especie es comúnmente reportada en inventarios rápidos, pero no se considera el detalle de los caracteres diagnósticos para la determinación individual, resultando en errores en la determinación de la especie, con profundas consecuencias en la distribución de la especie. A pesar de la posible o confirmada presencia de múltiples especies de *Trachycephalus* en Colombia (*T. coriaceus*, *T. jordani*, *T. resinifictrix*, *T. typhonius*, *T. venezolanus* y *T. cunauaru*) (Lynch 2005, Frost 2024), una rápida comparación de especímenes de museo asignados a *T. typhonius* de la Amazonia colombiana muestra varios errores de identificación, incluso considerando las notorias diferencias en morfología externa (Figura 1).

La condición parafilética de *T. typhonius* también fue revelada en un estudio molecular realizado con muestras de Ecuador (Ron et al. 2016). Las secuencias ecuatorianas del Chocó están relacionadas con *Trachycephalus* cisandinos, mientras que *T. typhonius* amazónicos (Perú y Ecuador) están relacionados con *T. resinifictrix* y *T. typhonius* venezolanos. En este estudio, Ron et al. (2016) asignaron el nombre *T. macrotis* a las poblaciones cisandinas ecuatorianas y peruanas, basándose en las fronteras políticas y no en criterios biológicos y geográficos pertinentes para la delimitación de especies. El estudio no incluyó muestras de América Central y el noroeste de América del Sur, por lo tanto, no se aplica un nombre definitivo para las poblaciones cis- y transandinas y mesoamericanas (véase también Lavilla et al. 2010 para una historia nomenclatural). En una acción informal, Frost (2024) utilizó el nombre disponible *T. "vermiculatus"* (Cope 1866) para poblaciones desde México y hacia el sur sin un límite bien definido en Sudamérica transandina. La inclusión de nuevos datos moleculares a lo largo del rango de distribución de la especie permite clarificar el estatus taxonómico y las poblaciones (Faivovich et al. 2005, Castellanos-Durán y Giraldo-Palacio 2022). Un estudio cuidadoso de todas estas poblaciones no sólo es taxonómicamente relevante sino que también podría ayudar a dilucidar la historia filogenética y biogeográfica de este clado (Blotto et al. 2020).

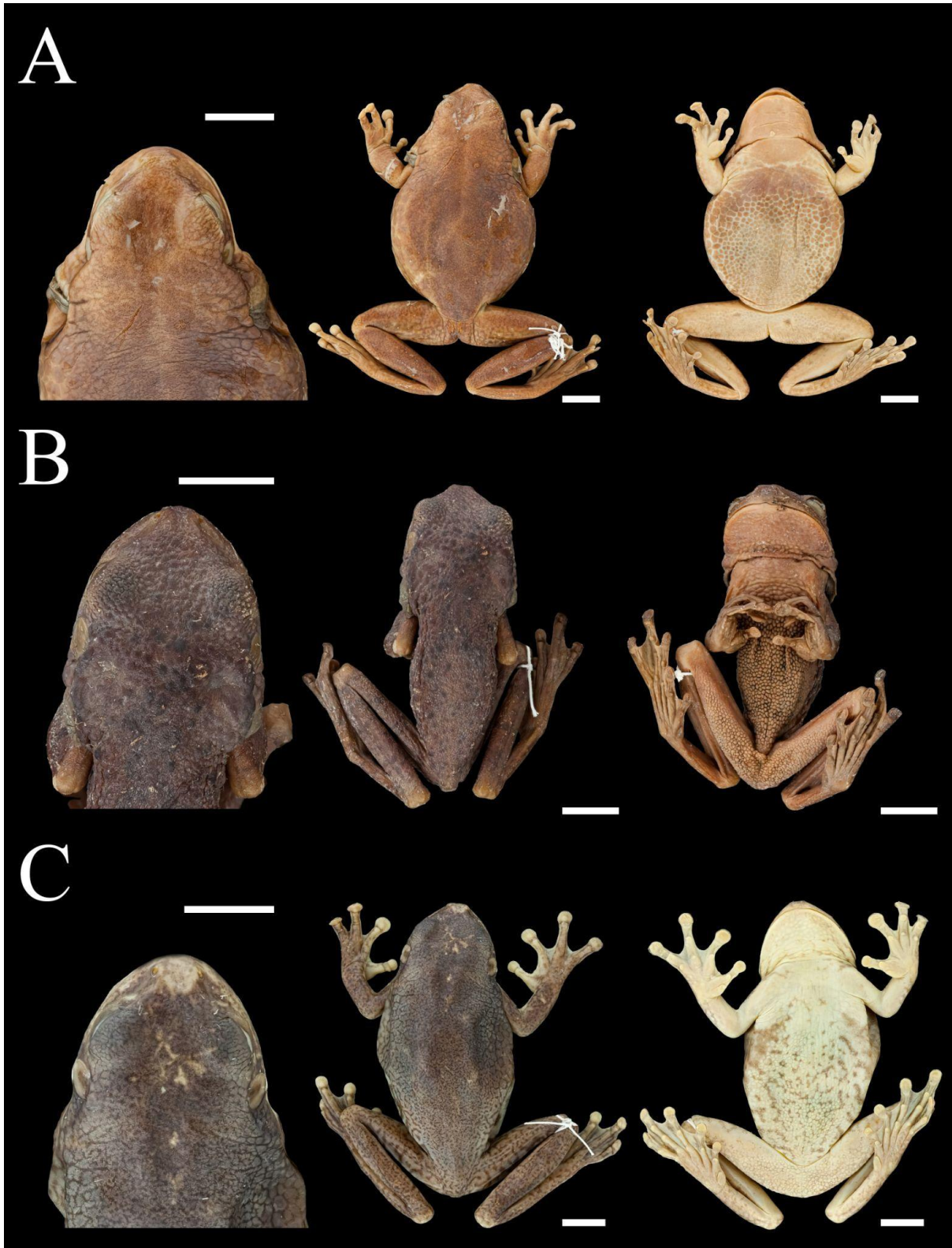


Figure 1. Variabilidad morfológica en especímenes de museo de la Amazonía colombiana anteriormente asignados erróneamente a *Trachycephalus typhonius*. (A) IAvH-Am-02308 corresponde a *T. cf. coriaceus*, (B) IAvH-Am-04632 corresponde a *T. cf. cunauaru* y (C) IAvH-Am-04916 no coincide con la combinación de caracteres de ninguna de las especies presentes en Colombia. (A) y (B) fueron colectadas en el Parque Nacional Natural Amacayacu y (C) en el municipio de Leticia. Las barras blancas indican 1 cm.

La identificación molecular de especies mediante el uso de ADNmt ayuda a resolver casos relacionados con la estructura poblacional, las barreras biogeográficas históricas y la diversidad críptica (Gehara et al. 2014, Guarnizo et al. 2015, Dudoit et al. 2018). Los marcadores de ADN mitocondrial se han utilizado sistemáticamente para descifrar la estructuración genética en linajes de anfibios (García-R et al. 2012; Crawford et al. 2013; Franco-Mena et al. 2023). Aquí usamos el caso de *T. typhonius* sensu lato para probar el papel del muestreo colombiano en desentrañar la estructura genética y la importancia de profundizar en la investigación de especies ampliamente distribuidas.

Métodos

Muestreo en campo

Las muestras de tejido se obtuvieron durante exploraciones de inventario de biodiversidad en nueve localidades en Colombia (Tabla S1), incluyendo sitios en el Caribe (una muestra) y el Valle Medio del Magdalena (siete muestras, localidades transandinas) y la región del del Orinoco (seis muestras, localidades cisandinas). Los individuos fueron censados visual y auditivamente (Angulo et al. 2006) en cada sitio durante búsquedas libres y transectos entre las 18:00 y 23:00 horas, identificando microhábitats como arroyos, acequias, lagunas y áreas inundadas. Cada transecto tenía una longitud variable entre 600 m y 2 km. Se recogió una submuestra del total de individuos encontrados en el campo y se tomaron fotografías in vivo de al menos un ejemplar por especie para obtener datos de coloración, atributos que se pierden en los ejemplares conservados en etanol. Posteriormente, los individuos fueron sacrificados mediante la aplicación de benzocaína tópica al 20% siguiendo el protocolo de Chen y Combs (1999). Una muestra de hígado o músculo por espécimen fue almacenada en solución de etanol al 96% y criopreservada en la colección de tejidos del Instituto Humboldt (IAVH-CT) (González y Arenas-Castro 2017). Los especímenes correspondientes fueron fijados con formalina analítica al 10%, conservados en etanol al 70% (Cortez et al. 2006) y depositados en las colecciones de anfibios del Instituto Humboldt (IAVH-Am).

Análisis moleculares:

La extracción de ADN del tejido se realizó siguiendo la metodología descrita por Ivanova et al. (2006). La cuantificación de la concentración de ADN en las muestras se estimó utilizando el instrumento NanoDrop One de Thermo Fisher Scientific. Tras la extracción, la amplificación de las regiones genéticas mitocondriales citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) y 16S rRNA, se realizó utilizando un conjunto de cebadores específicos. Para la región COI, se utilizó un cóctel de cebadores con LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', HCO2198 5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3', Lep-F1 5'- ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' y Lep-R1 5'- TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3' (Folmer et al. 1994; Hebert et al. 2004). Por su parte, para la región 16S se emplearon los cebadores 16SA-L 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' y 16SB-H 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (Palumbi et al. 1991).

Las condiciones de los ciclos térmicos para la amplificación de la COI incluían un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, recocido a 45 °C durante 40 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto.

Posteriormente, se realizaron 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 51 °C durante 40 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, seguidos de un paso final de extensión a 72 °C durante 5 minutos. Por otro lado, para la región 16S, las condiciones de los ciclos de PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 40 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos, con un paso final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

La verificación de la amplificación se llevó a cabo visualizando los productos de la PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) teñidos con GelRed® de Biotium. Los amplicones obtenidos se purificaron enzimáticamente utilizando el protocolo Exo-SAP. Los productos de PCR purificados se sometieron a secuenciación Sanger en el laboratorio Gencore de la Universidad de los Andes, utilizando un analizador genético ABI 3500 XL de Applied Biosystem. Los cromatogramas de secuenciación de ADN obtenidos fueron ensamblados y editados manualmente utilizando el software Geneious v10.2 (Kearse et al. 2012). Las secuencias de nucleótidos, los archivos de trazas y las imágenes se cargaron en BOLD Systems (www.boldsystems.org/) y están disponibles en el conjunto de datos DS-TRCIH24 (Tabla S1, el DOI se incluirá una vez que el manuscrito sea aceptado para su publicación).

Se realizaron búsquedas de datos disponibles en las bases de datos BOLD y GenBank para *T. typhonius* y otras especies de *Trachycephalus*. La divergencia de secuencias se estimó con el modelo de evolución de nucleótidos de Kimura de 2 parámetros (K2P) implementado por BOLD. Para representar gráficamente la divergencia entre especies, se generó un árbol Neighbour-Joining (NJ) basado en la divergencia de secuencias K2P. El soporte de los nodos se calculó con 1000 réplicas bootstrap. Comparamos las distancias genéticas de los linajes obtenidas en el análisis de delimitación (basado en consenso estricto) a partir del código de barras de ADN en anuros (Lyra et al. 2017, Amador et al. 2018). Para ello, calculamos las distancias K2P para los genes 16S y COI en MEGA versión 11 (Tamura et al. 2021).

Se realizaron análisis de agrupamiento para el conjunto de datos de especies. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD, Puillandre et al. 2012), que divide los agrupamientos en especies candidatas basándose en un umbral obtenido a partir de la distribución de distancias genéticas por pares dentro del mismo conjunto de datos (Paz y Crawford 2012, Guarnizo et al. 2015). Este análisis se realizó con parámetros predeterminados utilizando el modelo K2P. Además, utilizamos el número de índice de código de barras (BIN) proporcionado por BOLD Systems, que implementa RESL (Refined Single Linkage; Ratnasingham y Hebert 2013) para asignar códigos de barras de ADN a probables entidades taxonómicas disponibles en la base de datos. El algoritmo BIN se diseñó para proporcionar una estimación conservadora del recuento real de especies (Floren et al. 2020).

Utilizamos el modelo PTP de proceso de árbol multitasa (mPTP) (Kapli et al. 2017) en el servidor web <https://mptp.h-its.org> sobre el árbol multilocus inferido por Máxima Verosimilitud. Este análisis incorpora diferentes tasas de coalescencia entre clados, lo que permite diferentes niveles de diversidad genética intraespecífica (Kapli et al. 2017). Además, utiliza el número de sustituciones para identificar cambios significativos en las tasas de ramificación en una filogenia, por lo que no dependen de la precisión de las estimaciones ultramétricas del árbol. Además, puede superar a otros métodos de delimitación de especies cuando las distancias evolutivas son pequeñas (Pons et al. 2006).

Resultados

Generamos un alineamiento final de 1232 pares de bases (pb) para 70 muestras de diez especies: *Trachycephalus typhoni*, *T. coriaceus*, *T. nigromaculatus*, *T. imitatrix*, *T. mesophaeus*, *T. venulosus*, *T. quadrangulum*, *T. cunauaru*, *T. resinifictrix* y *T. macrotis*, incluidas muestras de Bolivia (3), Brasil (23), Colombia (14), Costa Rica (1), Ecuador (13), Guayana Francesa (10), Guayana (2), Perú (1), Venezuela (2) y una muestra de una localidad desconocida. Se utilizaron en total 95 secuencias: 42 del GenBank del NCBI, 27 secuencias de los sistemas BOLD y 26 secuencias generadas por nosotros para los genes 16S y COI (Tabla S1). Las secuencias obtenidas representan haplotipos únicos de los genes individuales. No detectamos ningún codón de parada en el gen codificador de proteínas (COI).

El ABGD para las secuencias COI devuelve 11 especies candidatas con divergencias intraespecíficas previas entre 0,0017 y 0,0077. Bajo este escenario, las muestras cis- y transandinas se dividieron en dos linajes aislados (Figura 2). El ABGD recupera sólo cuatro especies para divergencias intraespecíficas entre 0,0129 y 0,035, fusionando todas las muestras de *T. macrotis*, *T. typhoni*, *T. cunauaru*, *T. quadrangulum* y *T. resinifictrix* en un único linaje.

El análisis BIN para COI arroja nueve especies candidatas (Figura 2). Las secuencias COI en BOLD de *T. coriaceus* y *T. imitatrix*, no se asignaron a ningún BIN. En algunos casos, un solo BIN agrupaba más de una especie. Por ejemplo, el BIN BOLD:ACA4687 incluye *T. cunauaru* (Ecuador), *T. resinifictrix* (Brasil) y *T. typhoni* (Brasil). Además, las secuencias de una especie se dividieron en diferentes BIN, por ejemplo *T. resinifictrix* de Brasil (BOLD:ACA4687) se agrupó en un BIN diferente de la secuencia venezolana (BOLD:ACA5927) de la misma especie. Las muestras colombianas se dividieron en diferentes BIN en función de su distribución cis- o transandina. La muestra de Costa Rica se agrupó en el mismo BIN que las muestras transandinas de Colombia. Cinco BIN se agruparon como casos coincidentes: *T. macrotis* (BOLD:ADK1552), *T. mesophaeus* (BOLD:ACA3812), *T. nigromaculatus* (BOLD:ACF9093), *T. quadrangulum* (BOLD:ADJ5861), y la muestra tipo de *T. typhoni* de Guyana (BOLD:ACH6375).

Las distancias K2P entre todas las OTU sugeridas por BOLD y ABGD fueron relativamente bajas (Figura 3), oscilando entre 2,5 % y 7,8 % para COI y entre 0,3 % y 3,0 % para 16S. Las muestras cis- y transandinas mostraron las distancias más cortas entre ellas (2,5 % para COI y 0,6 % para 16S), seguidas por *T. macrotis* y *T. resinifictrix* venezolana (3,2 % para COI y 0,7 % para 16S).

Con base en los resultados del árbol de Máxima Verosimilitud para COI y 16S, las secuencias asignadas a *T. typhoni* caen en tres ramas diferentes en el árbol (Figura 4). El análisis fusionó las secuencias colombianas asignadas a *T. typhoni* en un solo clado, con una clara división de las secuencias cis-andinas y transandinas en dos linajes independientes. Estos dos clados se anidaron en un clado compuesto por el *T. macrotis* ecuatoriano y el *T. resinifictrix* de Venezuela. El clado completo de las primeras secuencias se anidó en un clado que abarca el *T. typhoni* de la localidad tipo, Guayana, Guayana Francesa, y el estado de Roraima en Brasil. Todas estas muestras son hermanas de un clado compuesto por *T. typhoni* y *T. resinifictrix* de los estados de Bolivia, Pará, Mato Grosso y Amazonas en Brasil, además de *T. cunauaru* de Ecuador.

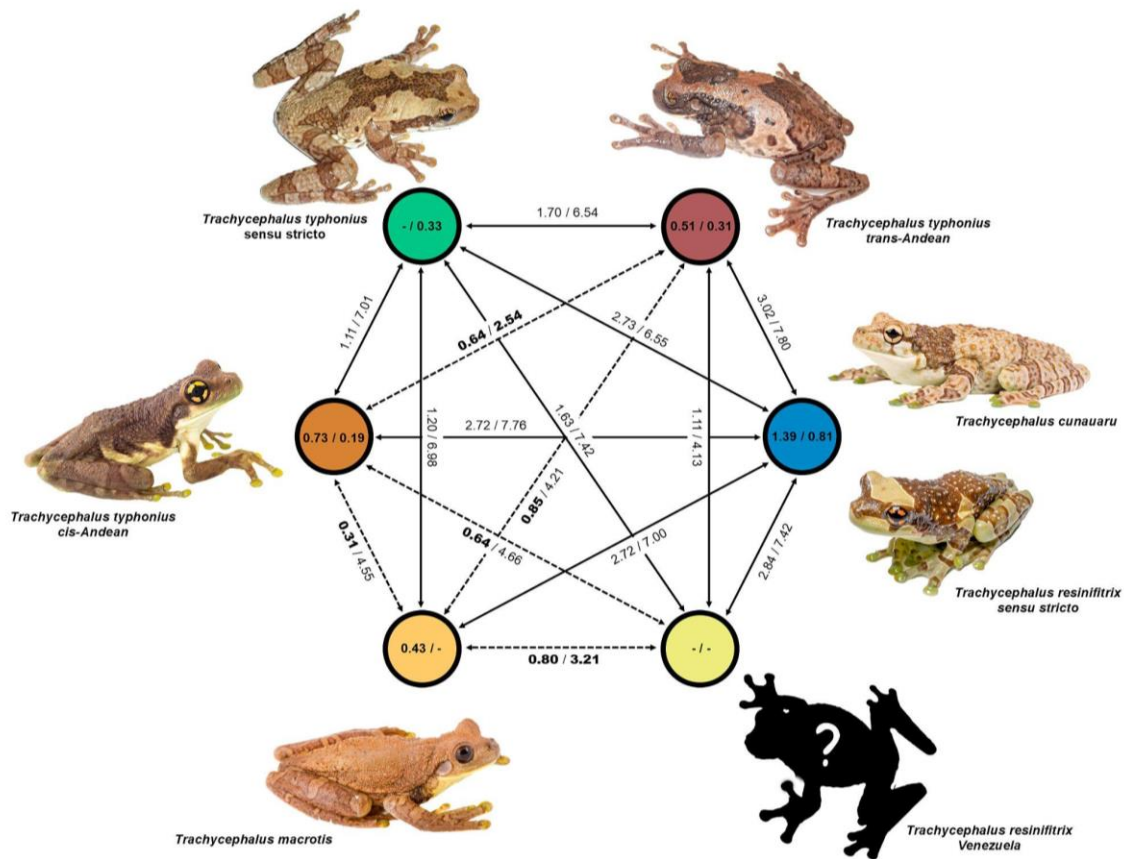


Figura 3. Distancias K2P media entre OTUs para los genes mitocondriales 16S (arriba) y COI (abajo).

Discusión

Nuestro trabajo llena el vacío en el rango de distribución para la parte norte de las poblaciones suramericanas para esta especie al incluir muestras de especímenes identificados como *T. typhonius* de poblaciones cisandinas y transandinas en Colombia. Los patrones detectados únicamente por ADNmt revelan información útil sobre la identidad de especie de las muestras asignadas a *T. typhonius* y, además, proporcionan ideas sobre los patrones biogeográficos de aislamiento de linajes en su rango de distribución.

¿Qué nos dice la incorporación de muestras colombianas sobre la identidad de especie del clado de *T. typhonius*?

Revelar diversidad críptica en especies «generalizadas» es una tendencia común en anfibios neotropicales (Lyra et al. 2017). Con base en el análisis del ADN mitocondrial, nuestros resultados apoyan que las poblaciones colombianas representan un linaje diferente a *T. typhonius sensu stricto*, y las poblaciones colombianas cisandinas y transandinas podrían considerarse OTUs únicas, diferentes de *T. macrotis*. Curiosamente, debido a la baja variación en las secuencias 16S (Figura 2), no hay consenso en las pruebas de delimitación molecular para los linajes de *T. macrotis* y *T. typhonius* colombiano. Mientras que mPTP devuelve un único linaje, ABGD y BIN sugieren tres linajes para las mismas muestras. Esta discordancia representa un reto para la delimitación de especies basada en pruebas moleculares.

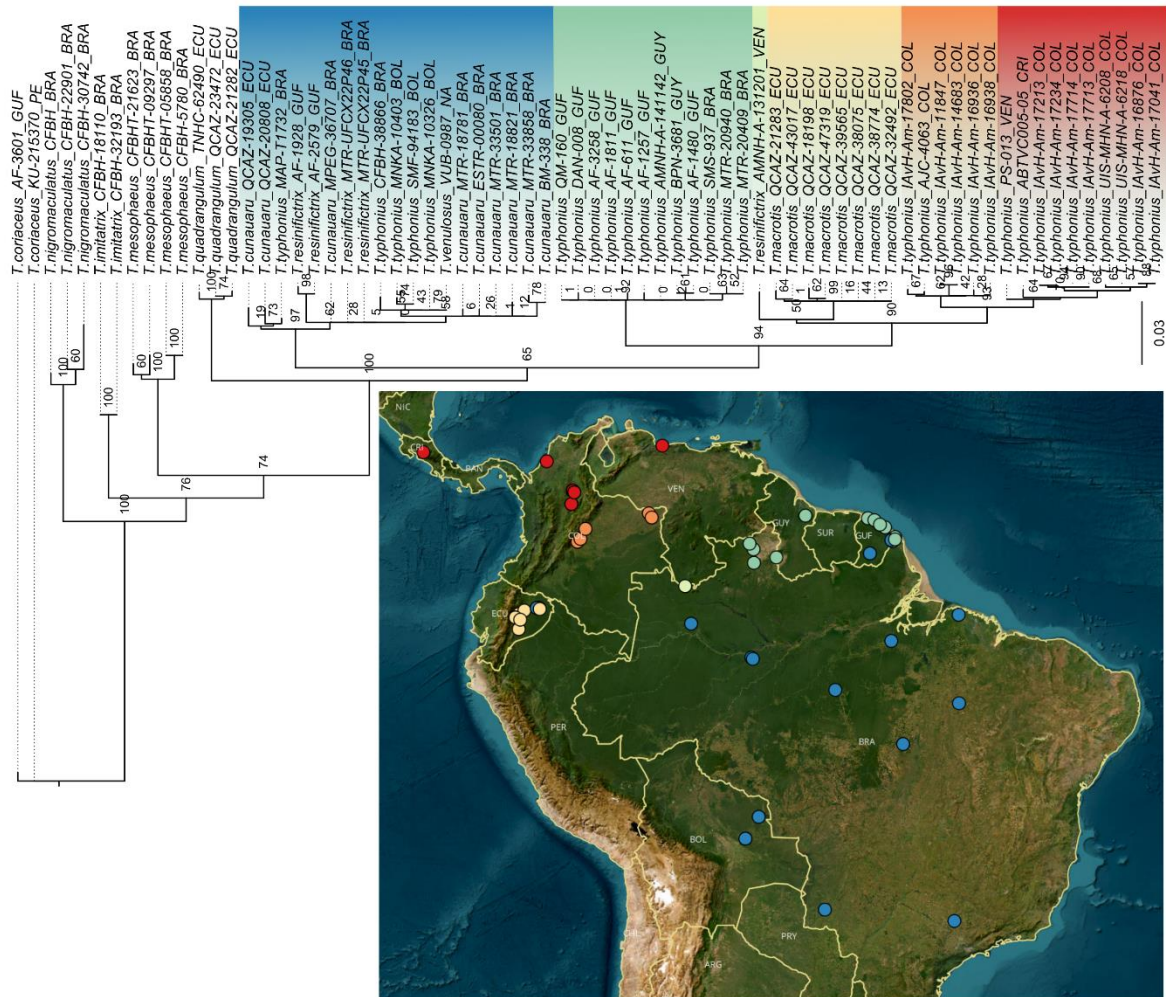


Figura 4. Árbol de máxima verosimilitud para 16S y COI y ubicación de todas las muestras de *Trahycephalus typhonius* y parientes por asignación de OTU (ABGD y BOLD). Las barras superiores indican la agrupación generada por mPTP. Véase la tabla S1.

Apelar a la diversidad críptica podría llevar a una inflación taxonómica, especialmente ante un muestreo geográfico limitado y una falta de caracteres diagnósticos claros, llevando en algunos casos a la refutación de especies recién descritas (Arias-Cárdenas et al. 2024). Estudios anteriores han delimitado especies de anuros neotropicales con una distancia COI K2P superior al 4 %, sin embargo, este umbral suele ser objeto de discusión (Lyra et al. 2017). Mientras que este umbral fue suficiente para dividir recientemente *Boana platanera* y *B. xerophylla* (Escalona et al. 2021), la independencia de linajes fue profundamente discutida recientemente en el caso de *Dendropsophus molitor* - *D. luddeckei* (Arias-Cardenas et al. 2024).

En este escenario, sugerimos que la taxonomía del complejo *T. typhonius* debería ser revisada y examinada más a fondo. Nuestros resultados proporcionan algunas diferencias que podrían servir como punto de partida para este propósito. Teniendo en cuenta la variación morfológica de esta especie (Figura 5), un enfoque integrador con múltiples líneas de evidencia (por ejemplo, incluyendo la morfología de los renacuajos y la bioacústica) podría aclarar mejor su taxonomía y conducir a descripciones formales de las especies (Franco-Mena et al. 2024). Debería hacerse más hincapié en

las localidades mal muestreadas para garantizar que representan lagunas reales en la distribución de la especie y no sesgos debidos al esfuerzo de muestreo (Kieswetter y Schneider 2013).

Además, nuestros resultados también revelan la importancia del uso de datos públicos disponibles. Al incluir *T. typhonius* de varias otras localidades disponibles en repositorios públicos publicados por Jansen et al. (2011) y Vacher et al. (2020), nuestro análisis recuperó suficientes datos para apoyar un solo linaje que incluye individuos de Brasil, Bolivia asignados a *T. typhonius*, *T. cunauaru* de Ecuador y, *T. resinifictrix* de Brasil (incluyendo la localidad tipo). Estos resultados sugieren que los especímenes identificados como *T. typhonius* de la Amazonia occidental, central y meridional deben asignarse a *T. cunauaru* o *T. resinifictrix*. En este caso, dado que *T. cunauaru* y *T. macrotis* son simpátricas en parte de la Amazonia occidental (Ron et al. 2016), y dado que estas dos especies pueden diferenciarse fácilmente por su morfología externa, un examen cuidadoso de los especímenes de museo podría ayudar en la asignación de especies de ambos linajes.

¿Qué nos dice la incorporación de muestras colombianas sobre los patrones biogeográficos andinos y amazónicos?

La adición de datos colombianos revela un patrón biogeográfico interesante que se alinea con la regionalización biogeográfica actual en la que la Orinoquia y las tierras bajas transandinas constituyen un dominio biogeográfico diferente de la Amazonía (Morrone 2014). Como era de esperarse, cis-Andes y trans-Andes pueden diferenciarse por COI y existe amplia literatura sobre el efecto vicariante de los Andes sobre especies tanto de tierras altas como bajas (Bagley y Johnson 2014, Mendoza et al. 2019). Pero más allá de eso, las muestras cis-Andes colombianas asignadas a *T. typhonius* no se fusionaron con cis-Andes de la región amazónica (Figura 3). Así, 1) la mayor similitud genética entre *T. typhonius* cis-Andes y trans-Andes y 2) la profunda divergencia entre las muestras cis-Andes del norte y sur encontradas aquí sugieren un antiguo aislamiento dentro de los linajes cis-Andes y un reciente proceso de dispersión-vicarianza a través de los Andes, desafiando el clásico y simple escenario de mera vicarianza por sistemas montañosos (Salgado-Roa et al. 2024).

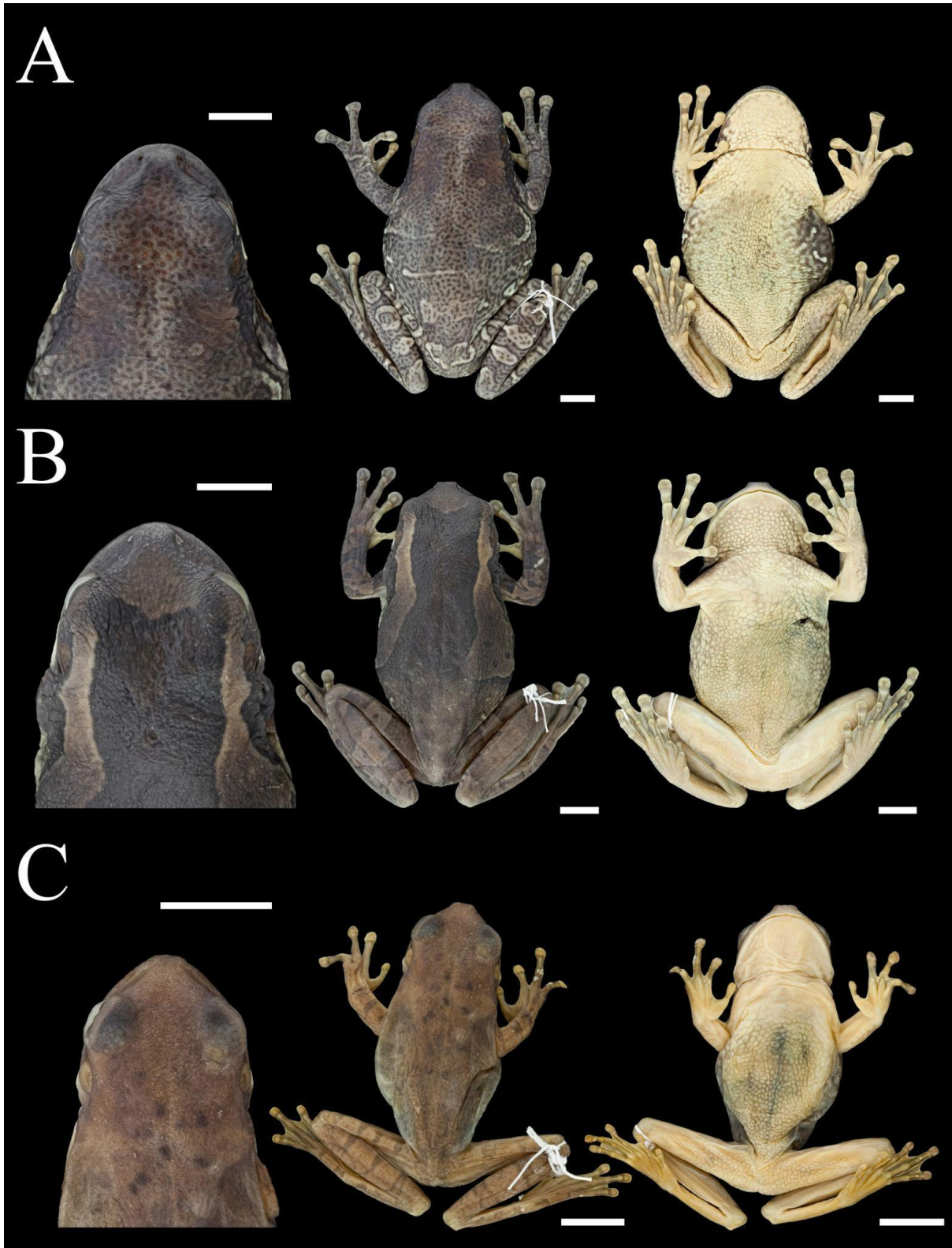


Figura 5. Variabilidad morfológica de las poblaciones colombianas de *Trachycephalus "typhonius"*. A IAvH-Am-14683 de Puerto Carreño, Vichada, B. IAvH-Am-16876 de Puerto Wilches, Santander, C IAvH-Am-11417 de Puerto Nariño, Amazonas. A y C corresponden a poblaciones cisandinas, orinoquías y amazónicas, respectivamente. B corresponde a una población trasandina. Las barras blancas indican 1 cm.

En el primer caso, la probable divergencia reciente entre cis-Andes y trans-Andes sugiere que la cordillera de los Andes es una barrera parcial a la dispersión para los linajes de tierras bajas, seguida por una vicarianza reciente (Smith et al. 2014, Bemmels et al. 2018) y probablemente poco tiempo para la diferenciación genética, similar a los datos encontrados para *Hyalinobatrachium tatayoi* (Mendoza et al. 2019). La elevación no homogénea a lo largo de los Andes (Gregory-Wodzicki 2000) podría actuar como una barrera semipermeable que permitió una reciente dispersión de lado a lado (Scotti-Saintagne et al. 2013, Smith et al. 2014). De hecho, existen evidencias de continuidad ecológica histórica a través de pasos bajos para otros vertebrados, promoviendo la conectividad poblacional a través de los Andes (Haffer 1967, Cadena et al. 2016). Los candidatos de este paso bajo (Hazzi et al. 2018), necesitan ser probados con enfoques filogeográficos más profundos incluyendo filogenias calibradas en el tiempo para anidar los cambios geológicos con la historia evolutiva de las especies.

En el segundo caso, la profunda divergencia entre los linajes cisandinos del norte y del sur es un patrón que coincide con las profundas diferencias entre la sabana de la Orinoquia y la selva amazónica. Las barreras ambientales son importantes para las especies filopátricas y de baja movilidad como los anfibios (Beebee 2005), que también son muy susceptibles a pequeños cambios en su entorno (Navas 2006). Aquí, la transición Amazonía/Orinoquia explica la diferenciación genética en taxones de tierras bajas ampliamente distribuidos en el Neotrópico (Arbeláez-Cortés 2020, Vacher et al. 2020) y el aislamiento de las poblaciones del Orinoco en anuros coincide con el patrón filogeográfico encontrado para *Elachistochleis* sp. (Jowers et al. 2021), otra “especie ampliamente distribuida” que se revela parafilética en múltiples linajes aislados. Los Llanos de Venezuela y Colombia son uno de los puntos fríos de especies de anfibios recientemente descritas en América del Sur (Vasconcelos et al. 2019). Nuestros hallazgos pueden ayudar no solo a resolver la historia evolutiva de cierto linaje, sino también servir como casos de estudio para la comprensión de los procesos detrás de las pocas sabanas del Orinoco estudiadas, en términos de procesos evolutivos y biogeográficos (Jaramillo 2023).

Por último, la heterogeneidad de los hábitats de las tierras bajas de la Amazonia a veces se subestima y, debido a que la región se ha percibido erróneamente como un ecosistema grande y homogéneo, muchos taxones se han considerado erróneamente como generalistas y de amplia distribución (Guayasamin et al. 2024). En este caso, la presencia de múltiples linajes asignados a *T. typhonius* en rangos superpuestos para algunas partes de la región amazónica (Figura 3) muestra que estas poblaciones podrían albergar una diversidad oculta, incluso más allá de las biorregionalizaciones sugeridas para aves y anfibios (Silva et al. 2019, Réjaud et al. 2019, Vacher et al. 2020). Los datos a lo largo de todo el rango de distribución de los tres linajes asignados a *T. typhonius* y especies relacionadas (*T. resinifictrix*, *T. cunauaru* y *T. macrotis*) proporcionan un sistema de estudio interesante para evaluar el papel de las áreas biogeográficas amazónicas en la especiación y diversificación de linajes recientes (Guayasamin et al. 2024).

El impacto y los obstáculos del muestreo colombiano

La inclusión limitada o nula de datos de Colombia, como se destaca con la herpetofauna (Vásquez-Restrepo 2021), ignora la importancia de la posición geográfica del país en el continente, que, a través de estudios que involucren especies ampliamente distribuidas, puede acercarnos a una comprensión fundamental de la historia evolutiva de la diversidad neotropical (Avendaño et al. 2017, Arbeláez-Cortés 2020, González-Orozco 2023). Es importante seguir ampliando el conocimiento y evitar el

déficit Wallaceano, particularmente en estas especies que pueden ser complejas o tener una diversidad críptica. En este sentido, es importante promover y facilitar la colaboración científica entre países (Avendaño et al. 2017) para la inclusión de datos de Colombia en estudios amplios.

El retraso de las políticas nacionales de acceso a los recursos genéticos para fines de investigación científica limitó durante años el muestreo y procesamiento de ADN para estudios moleculares en Colombia (Arbeláez-Cortés et al. 2015, Saboya-Acosta y Urbina-Cardona 2023). Afortunadamente, en la última década, la extracción de tejidos se convirtió en un procedimiento estándar para la preparación de especímenes (González y Arenas-Castro 2017), fortaleciendo el valor y la utilidad de los especímenes colectados. Actualmente, el material genético proveniente de expediciones de inventarios de biodiversidad en varias regiones del país y vinculado a colecciones de especímenes (p. ej., expediciones Colombia BIO; Ayala López et al. 2018) se almacena en colecciones nacionales de tejidos disponibles para todos los investigadores (Arbeláez-Cortés et al. 2015). La información de las colecciones biológicas se pone cada vez más a disposición de forma gratuita en bases de datos públicas globales como GenBank o BOLD, y con el tiempo se comparten más datos abiertamente. Sin embargo, las barreras que enfrentan los países del Sur Global siguen siendo una brecha en la capacidad de generar información en comparación con los países del Norte Global (Amano y Sutherland 2013, Ocampo-Ariza et al. 2023). Esta brecha continúa obstaculizando el acceso a la tecnología y los suministros necesarios para obtener datos y abordar la necesidad apremiante de los países megadiversos de comprender su biodiversidad para protegerla.

Mejor conocimiento, mejores decisiones para la conservación de la herpetofauna

Ignorar el estudio de especies aparentemente “comunes” y ampliamente distribuidas puede obstaculizar los esfuerzos de conservación (Gaston y Fuller 2008). Sin claridad no solo sobre su taxonomía, sino también sobre sus tendencias poblacionales, distribución geográfica y requisitos de hábitat, estas especies podrían no recibir la atención necesaria (Stuart et al. 2004). Por ejemplo, las especies con datos deficientes (DD) o categorizadas como de preocupación menor (LC) pueden pasarse por alto, cuando existen incertidumbres sobre su verdadero estado de amenaza (Howard y Bickford 2014, Nori y Loyola 2015). Incluso especies que alguna vez fueron comunes pueden verse repentinamente desaparecidas, como la rana dorada panameña (*Atelopus zeteki*) y la rana de cristal gigante (*Centrolene geckoideum*).

La descripción formal de las especies es importante como elemento principal de la biología de la conservación (Gehara et al. 2013). El descubrimiento de nuevas especies a partir de una especie considerada “común” y “ampliamente distribuida” podría ser un resultado futuro de este estudio. Seguramente implicará cambios en la categoría de amenaza de las nuevas especies, que podrían tener una distribución restringida y estar sujetas a fuertes presiones. Incluso si las nuevas especies aún no están descritas formalmente, los datos moleculares junto con la historia biogeográfica pueden guiar la delimitación de Unidades Evolutivamente Significativas (UES, Hutama et al. 2017). De esta manera, aquí proporcionamos recursos para comprender patrones de diversidad y/o estructura genética de poblaciones en el futuro y complementar la toma de decisiones en estrategias de conservación (p. ej., índice Evolutionary Distinctiveness - ED, Evolutionarily Distinct and Globally Endangered - EDGE) desde perspectivas de biogeografía o conservación genética (Whittaker et al. 2005, Caviedes-Solis et al. 2020).

Agradecimientos

Los investigadores Eduardo Tovar Luque y Luis M. Leyton ayudaron en los procedimientos de laboratorio y adhesión de tejidos. Además, Daniela García Cobos, Eliana Barona-Cortés, Julio Suárez, Felipe Villegas, Uriel Jiménez, Santiago Chiquito, Alejandra María Salazar-Guzmán, Julián Rojas-Morales, Sebastián Duarte-Marín, Elson Meneses-Pelayo, Andrés Rymel Acosta-Galvis, Castro Jariyan y Heidi Marcela León Bautista ayudaron con su dedicación durante las expediciones realizadas.

Financiación

Este estudio fue posible gracias a recursos de los proyectos “Planificación Socioecológica en las áreas Operativas y Proyectadas de Ecopetrol como Aporte a una Transición hacia la Sostenibilidad” entre el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ecopetrol (convenios números 19-155 y 22 -077). Fondos del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia la Tecnología y la Innovación, Fondo Francisco José de Caldas (acuerdo 16-062), y proyectos entre el Instituto Humboldt y la Agencia Nacional de Hidrocarburos (acuerdos 21-095 y 21-450), el Departamento de Santander y la Universidad Industrial de Santander (acuerdo 17-199), y el Departamento de Vichada (acuerdo 15-14-322-304CE).

Declaración de disponibilidad de datos

Las secuencias de nucleótidos, los archivos de trazas y las imágenes se cargaron en GenBank y BOLD Systems (www.boldsystems.org/) y están disponibles en el conjunto de datos DS-TRCIH24 (Tabla S1, DOI se incluirá una vez que se acepte el manuscrito). publicación).

Referencias

Amador L, Parada A, D’Elía G, *et al.* Uncovering hidden specific diversity of Andean glassfrogs of the *Centrolene buckleyi* species complex (Anura: Centrolenidae). *PeerJ* 2018; **6**:e5856.

Amano T, Sutherland WJ. Four barriers to the global understanding of biodiversity conservation: wealth, language, geographical location and security. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013;**280**:20122649.

Angulo A, Rueda-Almonacid JV, Rodríguez-Mahecha JV, Marca E. Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: Una compilación. *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región Tropical Andina* 2006:135–171

Arbeláez-Cortés E. Defining the phylogeographic relationship between cis- and trans-Andean populations of *Dendrocicla fuliginosa* and *Xenops minutus* in Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 2020;**91**:e912984.

Arbeláez-Cortés E, Torres MF, López-Alvarez D, *et al.* Colombian Frozen Biodiversity: 16 Years Of The Tissue Collection Of The Humboldt Institute. *Acta Biológica Colombiana* 2015;**20**:163-173.

Arenas-Castro H, Berdejo-Espinola V, Chowdhury S, *et al.* Academic publishing requires linguistically inclusive policies. *Proceedings of the Royal Society B*, 2024;**291**:20232840.

Arias-Cárdenas A, Barrientos LS, Pardo-Díaz C, *et al.* Taxonomic inflation and a reconsideration of speciation in the Andes: the case of the high-elevation tree frog *Dendropsophus molitor* (Anura: Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2024;**200**: 763-775.

Avendaño JE, Arbeláez-Cortés E, Cadena CD. On the importance of geographic and taxonomic sampling in phylogeography: A reevaluation of diversification and species limits in a Neotropical thrush (Aves, Turdidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2017;**111**: 87-97.

Ayala López L, Murcia LM, Barriga J. Expediciones científicas nacionales: Colombia Bio-Colciencias. In Moreno LA, Rueda C, Andrade GI. (eds.). *Biodiversidad 2017. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 2018.

Bagley JC, Johnson JB. Phylogeography and biogeography of the lower Central American Neotropics: diversification between two continents and between two seas. *Biological Reviews*, 2014;**89**:767-790.

Beebee TJC. Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, 2005;**95**:423-427.

Bemmels JB, Wright SJ, Garwood NC, *et al.* Filter-dispersal assembly of lowland Neotropical rainforests across the Andes. *Ecography*, 2018;**41**:1763-1775.

Blotto BL, Lyra ML, Cardoso MC, Trefaut Rodrigues MR. *et al.* The phylogeny of the casque-headed treefrogs (Hylidae: Hylinae: Lophohylini). *Cladistics*, 2021;**37**: 36-72.

Boitani L, Maiorano L, Baisero D, *et al.* What spatial data do we need to develop global mammal conservation strategies? *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2011;**366**:2623–2632.

Cadena CD, Pedraza CA, Brumfield RT. Climate, habitat associations and the potential distributions of Neotropical birds: Implications for diversification across the Andes. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 2016;**40**, 275-287.

Castellanos-Durán JA, Giraldo-Palacios VA. *Trachycephalus typhonius* Linnaeus, 1758. *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*, 2022;**8**:93-101.

Caviedes-Solis IW, Kim N, Leaché AD. Species IUCN threat status level increases with elevation: a phylogenetic approach for Neotropical tree frog conservation. *Biodiversity and Conservation*, 2020;**29**:2515–2537.

Cepeda-Quilindo B, Rueda-Almonacid JV. *Atelopus* complejo ignescens. In: Rueda-Almonacid JV, Rodríguez-Mahecha JV, Lötters S, *et al.* (eds.) *Ranas arlequines*. Bogotá, Colombia: Conservación Internacional. Panamericana Formas e Impresos S. A., 2005.

Chen MH, Combs CA. An alternative anesthesia for amphibians: ventral application of benzocaine. *Herpetological Review*, 1999;**30**:34.

Collen B, Ram M, Zamin T, *et al.* The tropical biodiversity data gap: addressing disparity in global monitoring. *Tropical Conservation Science*, 2008;**1**:75-88.

Coloma LA, Carvajal-Endara S. *Atelopus pastuso*. In: Ron SR, Merino-Viteri A, Ortiz DA. (eds), Anfibios del Ecuador. Version 2022.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Atelopus%20pastuso>. (4 January 2025, date last accessed).

Coloma LA, Duellman WE, Almendáriz A, *et al.* Five new (extinct?) species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) from Andean Colombia, Ecuador, and Peru. *Zootaxa* 2010;**2574**:1–54.

Cope ED. On the structures and distribution of the genera of the arciferous Anura. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Series 2*, 1866;**6**:67–112.

Cortez AM, Suárez-Mayorga AM, López-López FJ. Preparación y preservación de material científico. In: Angulo A, Rueda-Almonacid JV, Rodríguez-Mahecha JV, *et al.* (eds). *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación Internacional*. Bogotá, Colombia. Panamericana Formas e Impresos S.A. 2006.

Crawford AJ, Cruz C, Griffith E, *et al.* DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Molecular Ecology Resources*, 2013;**13**:1005-1018.

Dudoit AA, Iacchei M, Coleman RR, *et al.* The little shrimp that could: phylogeography of the circumtropical *Stenopus hispidus* (Crustacea: Decapoda), reveals divergent Atlantic and Pacific lineages. *PeerJ*, 2018;**6**:e4409.

Escalona M, La Marca E, Castellanos M, *et al.* Integrative taxonomy reveals a new but common Neotropical treefrog, hidden under the name *Boana xerophylla*. *Zootaxa*, 2021;**4981**:401-448.

Faivovich J, Haddad CF, García PC, *et al.* 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* 2005;**294**:1–240.

Floren A, von Rintelen T, Hebert PD, *et al.* Integrative ecological and molecular analysis indicate high diversity and strict elevational separation of canopy beetles in tropical mountain forests. *Scientific Reports*, 2020;**10**:16677.

Folmer O, Black M, Hoeh W *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1994;**3**:294–299.

Fouquet A, Marinho P, Réjaud A, *et al.* Systematics and biogeography of the *Boana albopunctata* species group (Anura, Hylidae), with the description of two new species from Amazonia. *Systematics and Biodiversity*, 2021;**19**:375–399.

Franco-Mena D, Guayasamin JM, Andrade-Brito D *et al.* Unveiling the evolutionary relationships and the high cryptic diversity in Andean rainfrogs (Craugastoridae: *Pristimantis myersi* group). *PeerJ*, 2023;**11**:e14715.

Franco-Mena D, De la Riva I, Vega-Yáñez MA, *et al.* Simplifying the *Centrolene buckleyi* complex (Amphibia: Anura: Centrolenidae): a taxonomic review and description of two new species. *PeerJ* 2024;**12**:e17712.

Frost DR. 2025. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (*Date of access*). Electronic Database. American Museum of Natural History, New York, <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. (4 January 2025, date last accessed).

García-R JC, Crawford AJ, Mendoza ÁM, *et al.* Comparative phylogeography of direct-developing frogs (Anura: Craugastoridae: *Pristimantis*) in the southern Andes of Colombia. *PeerJ* 2012;**9**:e46077.

Gaston KJ, Fuller RA. Commonness, population depletion and conservation biology. *Trends In Ecology And Evolution*, 2008;**23**:14–19.

Gehara M, Canedo C, Haddad CF, *et al.* From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conservation Genetics*, 2013;**14**:973–982.

Guevara-Andino JE, Dávalos LM, Zapata F, *et al.* Neotropics as a Cradle for Adaptive Radiations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2024:a041452.

González MA, Arenas-Castro H. *Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 2017.

González-Orozco CE, Unveiling evolutionary cradles and museums of flowering plants in a neotropical biodiversity hotspot. *Royal Society Open Science*, 2023;**10**:230917.

Gotelli NJ, Booher DB, Urban MC *et al.* Estimating species relative abundances from museum records. *Methods in Ecology and Evolution*, 2023;**14**:431-443.

Gregory-Wodzicki KM, Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. *Geological Society of America Bulletin*, 2000;**112**:1091–1105.

Guarnizo CE, Paz A, Muñoz-Ortiz A *et al.* DNA barcoding survey of anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the impact of the Andes on cryptic diversity. *PLoS one*, 2015;**10**:e0127312.

Guayasamin JM, Ribas CC, Carnaval AC *et al.* Evolution of Amazonian biodiversity: a review. *Biodiversity and Conservation*, 2024;**54**:e54bc21360.

Gutiérrez-García TA, Vázquez-Domínguez E. Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research*, 2013;**79**:311–324.

Haffer J. Speciation in Colombian forest birds west of the Andes. *American Museum Novitates* 1967;**2294**:1–57.

Hazzi NA, Moreno JS, Ortiz-Movliav C. *et al.* Biogeographic regions and events of isolation and diversification of the endemic biota of the tropical Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018;**115**:7985–7990.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;**101**:14812–14817.

Hoorn CFP, Wesselingh FP, Ter Steege H, *et al.* Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* 2010;**330**:927–931

Howard SD, Bickford DP. Amphibians over the edge: silent extinction risk of Data Deficient species. *Diversity and distributions* 2014;**20**:837–846.

Hutama A, Dahruddin H, Busson F, *et al.* Identifying spatially concordant evolutionary significant units across multiple species through DNA barcodes: Application to the conservation genetics of the freshwater fishes of Java and Bali. *Global ecology and conservation*, 2017;**12**:170–187.

Ivanova NV, deWaard JR, Hebert PDN. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 2006;**6**:998–1002.

Jansen M, Bloch R, Schulze A, *et al.* Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica scripta*, 2011;**40**:567–583.

Jaramillo AF, La Riva I De, Guayasamin, JM, *et al.* Vastly underestimated species richness of Amazonian salamanders (Plethodontidae: Bolitoglossa) and implications about plethodontid diversification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2020;**149**:106841.

Jaramillo C. The evolution of extant South American tropical biomes. *New Phytologist*, 2023;**239**:477-493.

Jowers MJ, Othman SN, Borzée A, *et al.* Unraveling unique island colonization events in *Elachistocleis* frogs: phylogeography, cryptic divergence, and taxonomical implications. *Organisms Diversity & Evolution*, 2021;**21**:189-206.

Kapli P, Lutteropp S, Zhang J, *et al.* Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 2017;**33**:1630-1638.

Kearse M, Moir R, Wilson A, *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012;**28**:1647-1649.

Kieswetter CM, Schneider CJ. Phylogeography in the northern Andes: Complex history and cryptic diversity in a cloud forest frog, *Pristimantis w-nigrum* (Craugastoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013;**69**:417–429.

La Marca E, Azevedo-Ramos C, Scott N. *et al.* *Trachycephalus typhonius*. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/>. 2010. (4 January 2025, date last accessed).

Lavilla EO, Langone JA, Padial JM, *et al.* The identity of the crackling, luminescent frog of Suriname (*Rana typhonia* Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura). *Zootaxa* 2010;**2671**:17–30.

Linnaeus C. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. 10th Edition. Volume 1. Stockholm, Sweden: L. Salvii. 1758.

Lynch JD. Discovery of the richest frog fauna in the World—an exploration of the forests to the north of Leticia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 2005;**29**:581–588.

Lyra ML, Haddad, CF, de Azeredo-Espin, AML. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, 2017;**17**:966-980.

Magurran AE, Henderson PA. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*, 2003;**422**:714-716.

Mendoza AM, Bolívar-García W, Vázquez-Domínguez E, et al. The role of Central American barriers in shaping the evolutionary history of the northernmost glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *PeerJ*, 2019;**7**:e6115.

Mendoza-Henao AM, Arias E, Townsend JH., et al. Phylogeny-based species delimitation and integrative taxonomic revision of the *Hyalinobatrachium fleischmanni* species complex, with resurrection of *H. viridissimum* (Taylor, 1942). *Systematics and Biodiversity*, 2020;**18**: 464-484.

Menéndez-Guerrero PA, Lima dos Santos SP, Salazar-Nicholls MJ, et al. Cryptic diversity in toads of the *Rhinella marina* species group (Anura, Bufonidae) with a subjectively beautiful new species from Western Ecuador. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2024;**3**:zlad197.

Monsarrat S, Kerley GI. Charismatic species of the past: biases in reporting of large mammals in historical written sources. *Biological Conservation*, 2018;**223**:68-75.

Morrone JJ. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, 2014;**3782**:1-110.

Navas CA. Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: Insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integrative and Comparative Biology* 2006;**46**:82–91.

Nori J, Loyola R. On the worrying fate of data deficient amphibians. *PLoS One* 2015;**10**:e0125055.

Ocampo-Ariza C, Toledo-Hernández M, Librán-Embí F, et al. Global South leadership towards inclusive tropical ecology and conservation. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 2023;**21**:17-24.

Oliveira, U, Paglia AP, Brescovit AD et al. The strong influence of collection bias on biodiversity knowledge shortfalls of Brazilian terrestrial biodiversity. *Diversity and Distribution* 2016;**22**:1232–1244.

Palumbi S, Martin A, Romano, S. et al. *The simple fool's guide to PCR, Version 2.0*. Special Publication of the Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu. 1991.

Paz A, Crawford AJ. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: a comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *Journal of Biosciences* 2012;**37**:887-896.

Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 2006;**55**:595-609.

Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, *et al.* ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 2012;**21**:1864-1877.

Ratnasingham S, Hebert PD. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one*, 2013;**8**:e66213.

Réjaud A, Rodrigues MT, Crawford AJ, *et al.* Historical biogeography identifies a possible role of Miocene wetlands in the diversification of the Amazonian rocket frogs (Aromobatidae: Allobates). *Journal of Biogeography* 2020;**47**:2472-2482.

Riddle BR, Dawson MN, Hadly EA, *et al.* The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography* 2008;**32**:173–202.

Rojas RR, Fouquet A, Ron SR, *et al.* A Pan-Amazonian species delimitation: high species diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae). *PeerJ* 2018;**6**:e4941.

Ron SR, Venegas PJ, Ortega-Andrade HM, *et al.* Systematics of *Ecnomiohyla tuberculosa* with the description of a new species and comments on the taxonomy of *Trachycephalus typhonius* (Anura, Hylidae). *ZooKeys*, 2016;**630**:115.

Saboyá Acosta LP, Urbina-Cardona JN. Current state of knowledge of páramo amphibians in Colombia: Spatio temporal trends and information gaps to be strengthened for effective conservation. *Tropical Conservation Science* 2023;**16**:19400829231169984.

Salgado-Roa FC, Pardo-Díaz C, Rueda-MN. *et al.* The Andes as a semi-permeable geographical barrier: Genetic connectivity between structured populations in a widespread spider. *Molecular Ecology* 2024;**33**:e17361.

Scotti-Saintagne C, Dick CW, Caron H, *et al.* Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). *Journal of Biogeography* 2013;**40**:676-692.

Silva SM, Peterson AT, Carneiro L, *et al.* A dynamic continental moisture gradient drove Amazonian bird diversification. *Science Advances* 2019;**5**:eaat5752.

Smith BT, McCormack JE, Cuervo AM, *et al.* The drivers of tropical speciation. *Nature* 2014;**515**:406-409.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA., *et al.* Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 2004;**306**:1783-1786.

Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 2021;**38**:3022-3027.

Troudet J, Grandcolas P, Blin A., *et al.* Taxonomic bias in biodiversity data and societal preferences. *Scientific Reports* 2017;**7**:9132.

Vacher JP, Chave J, Ficetola FG *et al.* Large-scale DNA-based survey of frogs in Amazonia suggests a vast underestimation of species richness and endemism. *Journal of Biogeography* 2020;**47**:1781-1791.

Vasconcelos TS, da Silva FR, dos Santos TG, *et al.* *Biogeographic patterns of South American anurans*. Switzerland: Springer Nature. 2019.

Vásquez-Restrepo JD. Inclusion is not representativeness: the context of Colombian samples in the taxonomic and systematic mid-large herpetological literature. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 2021;**4**:236-247.

Whittaker RJ, Araújo MB, Jepson P, *et al.* Conservation biogeography: assessment and prospect. *Diversity and Distributions* 2005;**11**:3-23