



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Gradiente altitudinal y barreras geográficas en el fenotipo y estructura genética de la rana *Boana xerophyllus* en Colombia

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**RICARDO ANDRÉS MEDINA RENGIFO**

TUTORA PRINCIPAL:

**Dra. Ella Vázquez Domínguez, Instituto de Ecología, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa, Instituto de Ecología, UNAM**  
**Dr. Héctor T. Arita, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**MAYO, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Gradiente altitudinal y barreras geográficas en el fenotipo y estructura genética de la rana *Boana xerophyllus* en Colombia

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**RICARDO ANDRÉS MEDINA RENGIFO**

TUTORA PRINCIPAL:

**Dra. Ella Vázquez Domínguez, Instituto de Ecología, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa, Instituto de Ecología, UNAM**  
**Dr. Héctor T. Arita, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX.**

**MAYO, 2018**



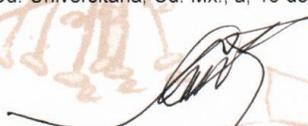
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de marzo de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, al alumno **MEDINA RENGIFO RICARDO ANDRÉS** con número de cuenta **516491198** con la tesis titulada: "**GRADIENTE ALTITUDINAL Y BARRERAS GEOGRÁFICAS EN EL FENOTIPO Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA RANA *Boana xerophyllus* EN COLOMBIA**", bajo la dirección de la **DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**:

Presidente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Vocal: DRA. LETICIA MARGARITA OCHOA OCHOA  
Secretario: DRA. GABRIELA PARRA OLEA  
Suplente: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA  
Suplente DR. ALEJANDRO EMMANUEL GONZÁLEZ VOYER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 16 de abril de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



### **Agradecimientos institucionales**

El presente trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; a la beca N° 585440 para estudios de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); a la beca mixta para apoyo de estancia de investigación otorgada por el CONACYT; a los apoyos PAEP 2016 y 2017 del Posgrado en Ciencias Biológicas; y a la valiosa asesoría del comité tutor integrado por la Dra. Ella Vázquez Domínguez, Dr. Juan Pablo Jaramillo y Dr. Héctor Arita.

## **Agradecimientos a título personal**

Este trabajo solo pude realizarlo gracias a la gran confianza q Ella al permitirme trabajar en su laboratorio, en un área completamente nueva para mí. Mi más sincero agradecimiento y solo espero que esta tesis sea la recompensa a tu gran confianza Ella.

De nuevo agradezco a los miembros de mi comité tutorial Dr. Héctor Arita y Dr. Juan Pablo Jaramillo por sus valiosos aportes y sugerencias a la hora de presentar mis avances.

A la Corporación Autónoma Regional de Tolima CORTOLIMA por los permisos de investigación biológica N° 2046 de 2012 y N° 3052 de 2014, y a la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA por el permiso N° 00771 de 2016 para la exportación de muestras biológicas.

Especiales agradecimientos a las entidades que permitieron hacer salidas de campo dentro de sus instalaciones, a la fundación Orquídeas del Tolima, Centro Universitario Regional del Norte (CURN) de la Universidad del Tolima, a la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima (CZUT), al Jardín botánico San Jorge, al centro recreativo Playa Hawai.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Genética y Ecología, especialmente a Tania, Susette, Xochil, Jessica, Sayra, Gaby, Madisson, Marco, Alejandro, Carlos y Oscar, con quienes pasé ratos muy agradables.

A los y las integrantes del GHEE: María Triana, Carlos Galindo, Paula Enciso, Andrés Viuche, Marcela Henao, Sigifredo Clavijo, Jorge Turriago, Tatiana Toro, James Herrán. Gracias por tomarse el tiempo de registrar datos, tomar muestras de tejidos y por la ayuda a la hora de tramitar el permiso de exportación, sin su desinteresado trabajo esta tesis no habría sido posible.

Al profesor Manuel Bernal que siempre ha sido mi gran apoyo académico en Colombia y con el que espero podamos colaborar por mucho tiempo.

A las personas que me ayudaron en campo, Alexandra Buitrago, Daniela Quintero, Carlos Galindo, Linda Celeste, David Salgado, Johan Romero, Juan David Hoyos, Sigifredo, Daniela Fonseca, a mis sobrinos Hamilton y Camila quienes fueron mi ayuda y esparcimiento a la hora de salir a campo. Muchísimas gracias por su tiempo.

A Ian, Drew, Guin, Emma y Mike, gracias por hacer de mi estancia en Berkeley una gran experiencia académica.

A Flavia Termignoni por su oportuna y desinteresada ayuda, además de las buenas sugerencias.

A Gissella Pineda, gracias por tu paciencia a la hora de soportar las innumerables frustraciones que tiene el proceso de aprender, muchas gracias por tu comprensión y colaboración.

Finalmente, a mi mamá Flor Edith, quien ha sido mi mayor apoyo en mis metas académicas. MIL GRACIAS Y TODO MI AMOR PARA TI MAMÁ !!

## Índice

Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción general.....	10
<b>Capítulo I.</b> Variación en la llamada y morfología de <i>Boana xerophyllus</i> en el Departamento del Tolima (Colombia).....	12
Introducción.....	13
Objetivos.....	14
Hipótesis.....	14
Materiales y métodos.....	15
Resultados.....	22
Discusión.....	28
Conclusiones.....	31
<b>Capítulo II.</b> Evolución y estructura genómica de <i>Boana xerophyllus</i> en el Departamento del Tolima (Colombia).....	32
Introducción.....	33
Objetivos.....	35
Hipótesis.....	35
Materiales y métodos.....	36
Resultados.....	44
Discusión.....	60
Conclusiones.....	64
Conclusiones generales.....	65
Referencias.....	67
Anexos.....	76

## Resumen

La adaptación local en muchas ocasiones es el primer paso para la diferenciación genética entre las poblaciones. Esta puede promover variación fenotípica que puede correlacionarse con la heterogeneidad espacial o ambiental. A nivel genómico y fenotípico, los efectos adaptativos de la heterogeneidad espacial o ambiental en zonas de transición entre diferentes regiones son un tema clave para entender la evolución y diversificación de los organismos. En este trabajo se exploran hipótesis adaptativas climáticas para comprender la divergencia fenotípica, efectos de barreras geográficas y ambientales, y posibles blancos de selección sobre el genoma en una rana tropical (*Boana xerophyllus*). A través de evidencia fenotípica (tamaño corporal y llamadas), molecular (secuencias mitocondriales, COI) y genómica (34,030 SNPs), los resultados sugieren adaptación en una clina ambiental (temperatura) por fuerte asociación ( $P < 0.01$ ) de SNPs candidatos a selección. SNPs con fuerte correlación ( $P < 0.01$ ) involucrados en diversificación del tamaño corporal y patrones de diferenciación genética, consistentes con hipótesis de aislamiento por ambiente en loci candidatos a selección y aislamiento por distancia en loci neutrales. Además, se evidenció parcialmente el efecto del río Magdalena como una barrera al flujo génico con SNPs, pero no con secuencias mitocondriales. Los resultados apoyan efectos de barreras geográficas parciales sobre la estructura genómica en presencia de flujo génico; asimismo, aislamiento por ambiente que puede estar promoviendo la diversificación fenotípica en un nuevo clado de *B. xerophyllus*.

## Abstract

Local adaptation is often the first step for genetic differentiation among populations. This can lead to phenotypic variation correlated with spatial or environmental heterogeneity. At genomic and phenotypic levels, the adaptive effects of spatial or environmental heterogeneity in transition zones between different regions are a key topic to understand the evolution and diversification of organisms. In this work, I test climatic adaptive hypotheses to understand the phenotypic divergence, effects of geographical and environmental barriers, and targets of selection on the genome in a tropical frog (*Boana xerophyllus*). Through multiple evidence like phenotypic divergence (body size and calls), and molecular (mitochondrial sequences, COI) and genomic (34,030 SNPs) analysis, the results suggest thermal adaptation in an environmental cline by strong association ( $P < 0.01$ ) of SNPs candidate for selection. SNPs with strong correlation ( $P < 0.01$ ) involved in diversification of body size and patterns of genetic differentiation, consistent with isolation by environment at SNPs candidate for selection and isolation by distance at neutral loci. In addition, the effect of the Magdalena River as barrier to gene flow with SNPs, but not with mitochondrial sequences. The results support the effects of partial geographical barriers on the genomic structure ongoing gene flow; likewise, isolation by environment that may be promote the phenotypic diversification in a new clade of *B. xerophyllus*.

## Introducción general

La variación fenotípica geográfica es una primera aproximación que permite sugerir que las fuerzas microevolutivas, tales como la selección, la deriva génica, la mutación o el flujo génico están actuando entre las poblaciones. A escala del paisaje tres fuerzas principalmente pueden actuar. La primera, la selección, puede llevar a variación adaptativa, cuando la heterogeneidad espacial o ambiental promueven la adaptación local por selección divergente entre ambientes (Savolainen et al. 2013). La segunda fuerza, la deriva génica, puede llevar a divergencia poblacional, aunque esta variación neutral (no adaptativa) se presenta sin correlación espacial o ambiental. La deriva al ser una fuerza estocástica (Hamilton 2009; Hedrick 2010) puede llevar a que alelos con impacto en el fenotipo se fijen por efecto de aislamiento (reducción del flujo génico) y tamaño poblacional, como se ha sugerido en poblaciones de pigmeos Africanos (Verdu et al. 2009). Finalmente, el flujo génico también puede promover la diversificación poblacional y la adaptación (Savolainen et al. 2013; Tigano & Friesen 2016). Aunque el flujo génico es considerado como una fuerza homogeneizadora (Hamilton 2009; Hedrick 2010) que incluso puede introducir alelos deletéreos a poblaciones localmente adaptadas (Richardson et al. 2016), las revisiones de Savolainen et al. (2013) y Tigano & Friesen (2016) sugieren que unos pocos alelos con gran impacto en el fenotipo y bajo fuerte selección, pueden fijarse aún en presencia de este. Otra forma en que el flujo génico puede promover la adaptación local es a través de introgresión adaptativa (Norris et al. 2015), en donde se introducen alelos benéficos entre especies. En ambos casos, el efecto homogeneizador de la selección puede llevar a una rápida adaptación dependiendo de la intensidad de la selección (Savolainen et al. 2013; Tigano & Friesen 2016) y la conectividad entre las poblaciones (Creech et al. 2017). Lo que significa, que las poblaciones pueden alcanzar óptimos adaptativos diferentes, debido presiones de selección diferentes a lo largo de un paisaje; sin embargo, si la presión de selección pasa a ser uniforme a lo largo de las poblaciones, el flujo génico entre estas puede promover la adaptación debido a que una o varias poblaciones localmente adaptadas pueden actuar como fuente de alelos adaptativos para las poblaciones no adaptadas. Este proceso ha sido simulado por Creech et al. (2017) quienes encontraron que la conectividad funcional (flujo génico) es indispensable para el potencial adaptativo de las especies a largo plazo.

La adaptación local en muchas ocasiones es el primer paso hacia la diferenciación genética de las poblaciones (De Kort et al. 2014; Soria-Carrasco et al. 2014; Mazzarella et al. 2016). La adaptación local, puede presentarse como respuesta a la heterogeneidad del paisaje, en donde se espera que los alelos sujetos a selección se presenten con mayor frecuencia en ambientes en donde contribuyen a incrementar la adecuación (Hoban et al. 2016). Por otro lado, el flujo génico como fuerza evolutiva homogeneizadora (Hamilton 2009; Hedrick 2010), puede introducir alelos deletéreos que influyen en el éxito reproductivo de los individuos a nivel local (Howard D. Rundle & Nosil 2005; Wang & Bradburd 2014; Richardson et al. 2016). Así, si la selección es débil sobre los alelos, estos pueden perderse por efecto de la combinación entre deriva y flujo génico (Yeaman & Otto 2011). No obstante, la adaptación local también puede ocurrir bajo flujo genético fuerte, si unos pocos alelos presentan un gran efecto (Savolainen et al. 2013) o cuando un grupo de alelos con poco efecto están ligados (Griswold 2006; Yeaman & Otto 2011). Por tal razón, la reducción de la conectividad funcional (Brooks 2003; Manel & Holderegger 2013; Balkenhol et al. 2015) no es necesaria para que la adaptación ocurra (Tigano & Friesen 2016).

Recientemente, el uso de secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés) con técnicas como la representación reducida del genoma (RRLs por sus siglas en inglés) (Davey et al. 2011; Jiang et al. 2016), junto con el desarrollo de recursos computacionales para ensamblar genomas *de novo* (Baker 2012), han sido fundamentales para estudiar las fuerzas microevolutivas. Con estos nuevos enfoques también ha sido posible desarrollar métodos para detección de loci candidatos a selección, y así determinar posibles señales de adaptación en ambientes heterogéneos a una escala del paisaje.

En anfibios se han empleado NGS y RRLs en numerosos estudios, incluyendo sistemática y filogenética para resolver las relaciones de especies y comparación de métodos tradicionales (secuenciación Sanger; Barrow et al. 2014), en filogenómica para entender la dirección del flujo e introgresión en ranas mexicanas (Streicher et al. 2014), en filogeografía probando dispersión y especiación en islas (Bell et al. 2015), probando nuevos modelos filogeográficos (Thomé & Carstens 2016), delimitando especies crípticas (Chan et al. 2017), determinando estructura genética y direccionalidad del flujo génico en *Rana boylei* (McCartney-Melstad et al. 2017) y evaluando factores espaciales sobre el flujo génico (Grummer & Leaché 2017). No obstante, aunque una de las principales metas en la genómica del paisaje es la posibilidad de rastrear loci sujetos a selección que puedan correlacionarse con factores ambientales (Holderegger et al. 2006), a la fecha pocos estudios han explorado las bases genómicas y fenotípicas de la adaptación local en anfibios (Guo et al. 2016), incluso en regiones heterogéneas, biogeográficamente importantes, y altamente ricas en anfibios como los Andes tropicales y Tumbes-Chocó-Magdalena (Zachos & Habel 2011).

Por lo anterior, este trabajo se divide en dos capítulos. El primero, abarca evidencia correlativa entre una clina altitudinal (climática), con la divergencia en llamadas y el tamaño corporal de una especie de rana tropical (*Boana xerophyllus*) en Colombia. Este primer capítulo sugiere adaptación local por cambios en el fenotipo de las poblaciones de *B. xerophyllus* a lo largo de la clina que ocurre entre dos ecosistemas, el bosque seco tropical y el bosque húmedo tropical. El segundo capítulo explora la evolución molecular (secuencias mitocondriales, gen COI) y efectos de barreras geográficas y climáticas sobre el flujo génico, así como hipótesis de adaptación climática, estructura genómica (genes nucleares, SNPs) asociada a barreras geográficas y procesos de aislamiento por ambiente de *B. xerophyllus* en el Departamento del Tolima (Colombia). Este segundo capítulo indica que *B. xerophyllus* del Departamento del Tolima es un clado independiente, con flujo génico entre sus poblaciones, que presenta loci candidatos a selección climática, así como loci correlacionados con diversificación fenotípica, estructura genómica parcial debido a barreras geográficas y climáticas, además de patrones evolutivos como aislamiento por ambiente y aislamiento por distancia, actuando de forma heterogénea sobre el genoma.

## **Capítulo I**

### **Variación en la llamada y tamaño corporal de *Boana xerophyllus* en el Departamento del Tolima (Colombia)**

## Introducción

La variación fenotípica geográfica puede ser adaptativa cuando las poblaciones están asociadas con heterogeneidad espacial o ambiental significativa, lo que puede resultar en adaptación local por selección divergente entre ambientes (Kawecki & Ebert 2004; Blanquart et al. 2013). Asimismo, si la selección es intensa y, dependiendo del organismo, después de cierto tiempo puede darse aislamiento reproductivo y procesos de especiación ecológica (Schluter 2001; H D Rundle & Nosil 2005; Nosil 2012).

En anuros (ranas), uno de los tres órdenes de anfibios que se caracterizan por ser tetrápodos sin cola, con alta dependencia a la humedad y ciclos de vida complejos (Root & Hall 1930; Duellman & Trueb 1994; Wells 2007a), es común que exista variación fenotípica geográfica. Dicha variación ha sido considerada como adaptativa en procesos de selección sexual y natural sobre los polimorfismos en ranas venenosas (Noonan & Comeault 2009; Medina et al. 2013; Galeano & Harms 2016). Por otro lado, la variación acústica en anuros parece ser un patrón ubicuo (Ryan & Wilczynski 1991; Bernal et al. 2005; Rodríguez et al. 2010; Jang et al. 2011; Pettitt et al. 2013; Zhou et al. 2014 Lee et al. 2016), la cual ha sido descrita en diferentes estudios como un patrón clinal a lo largo de gradientes de altitud (Narins & Smith 1986; Hasegawa et al. 1999; O'Neill & Beard 2011). Incluso, este patrón de variación en señales acústicas ha sido considerado como el primer paso en procesos de especiación (Narins & Smith 1986; Funk et al. 2016).

*Boana xerophyllus* (Duméril & Bibron 1841) es una especie de rana arborícola, de hábitos nocturnos, con un amplio rango de distribución (Orrico et al. 2017). En Colombia, esta habita las dos principales bioregiones, los Andes Tropicales y Tumbes-Chocó-Magdalena (Zachos & Habel 2011). Estas bioregiones presentan condiciones ambientales y espaciales muy diferentes, con ecosistemas diversos, lo que sugiere que las poblaciones de *B. xerophyllus* pueden experimentar fuertes presiones de selección debido a la heterogeneidad espacial y ambiental.

Como muchas ranas, *B. xerophyllus* presenta dimorfismo sexual, en donde las hembras son fundamentalmente más grandes que los machos (Orrico et al. 2017), pudiendo incluso pesar el doble que estos (observaciones propias). Además, como la gran mayoría de Anuros, sólo ha sido reportado que los machos cantan en esta especie (Orrico et al. 2017). En Colombia, las poblaciones son significativamente más pequeñas que las de Panamá y la cuenca del Orinoco (Kluge 1979), por lo que se reconoce que existe variación del tamaño corporal entre sus poblaciones. No obstante, el papel evolutivo (adaptación local por heterogeneidad ambiental) de la variación fenotípica en esta especie permanece incierto.

Teniendo en cuenta este escenario, el presente trabajo evalúa si la variación de rasgos fenotípicos, como tamaño del cuerpo, y aspectos temporales y espectrales de la llamada de *B. xerophyllus*, están asociados con un gradiente altitudinal (climático), sugiriendo así un efecto adaptativo mediado por la temperatura.

## Objetivos

### Objetivo general

- Determinar patrones de variación fenotípica (llamadas y tamaño corporal) en *Boana xerophyllus* a lo largo de su distribución en el Departamento del Tolima (Colombia)

### Objetivos específicos

- Evaluar los patrones de tamaño corporal de *B. xerophyllus* asociados con un gradiente altitudinal
- Caracterizar, a través de parámetros temporales y espectrales, los patrones de llamadas de anuncio de *B. xerophyllus*

## Hipótesis

**H1.** Las poblaciones de *Boana xerophyllus* presentarán un patrón de variación morfológica (tamaño corporal) correspondiente con un patrón clinal

### Predicciones

- *Boana xerophyllus*, a lo largo de su gradiente altitudinal, presentará un patrón clinal morfológico, con individuos más grandes en poblaciones a mayor altitud. Asimismo, el patrón de llamadas será de frecuencia más baja en los individuos que habitan en altitudes mayores

## Materiales y métodos

### ***Boana xerophyllus* (Amphibia: Anura: Hylidae) como modelo de estudio**

*Boana xerophyllus* (Duméril & Bibron 1841) es una especie de rana arborícola, de hábitos nocturnos, con un amplio rango de distribución que va desde Panamá, pasando por la parte norte de Colombia, Venezuela, Guyana y algunas localidades del noroccidente de Brasil, por debajo de los 2450 m (Fig. 1) (Orrico et al. 2017). En Colombia habita tanto los Andes Tropicales como en la bioregión Tumbes-Chocó-Magdalena, dos principales Hotspots (Zachos & Habel 2011). Debido a su amplia distribución altitudinal (desde el nivel del mar hasta los 2450 m), las poblaciones ocurren en diferentes ecosistemas como el bosque seco tropical o el bosque húmedo tropical. Esto sugiere que las poblaciones pueden experimentar una amplia heterogeneidad ambiental y espacial que puede llevar a procesos de adaptación local. Presenta dimorfismo sexual, en donde las hembras son considerablemente más grandes que los machos. Además, se ha comprobado que existe variación en el tamaño corporal entre poblaciones, por ejemplo en Colombia son significativamente más pequeñas que en Panamá y la cuenca del Orinoco (Kluge 1979).

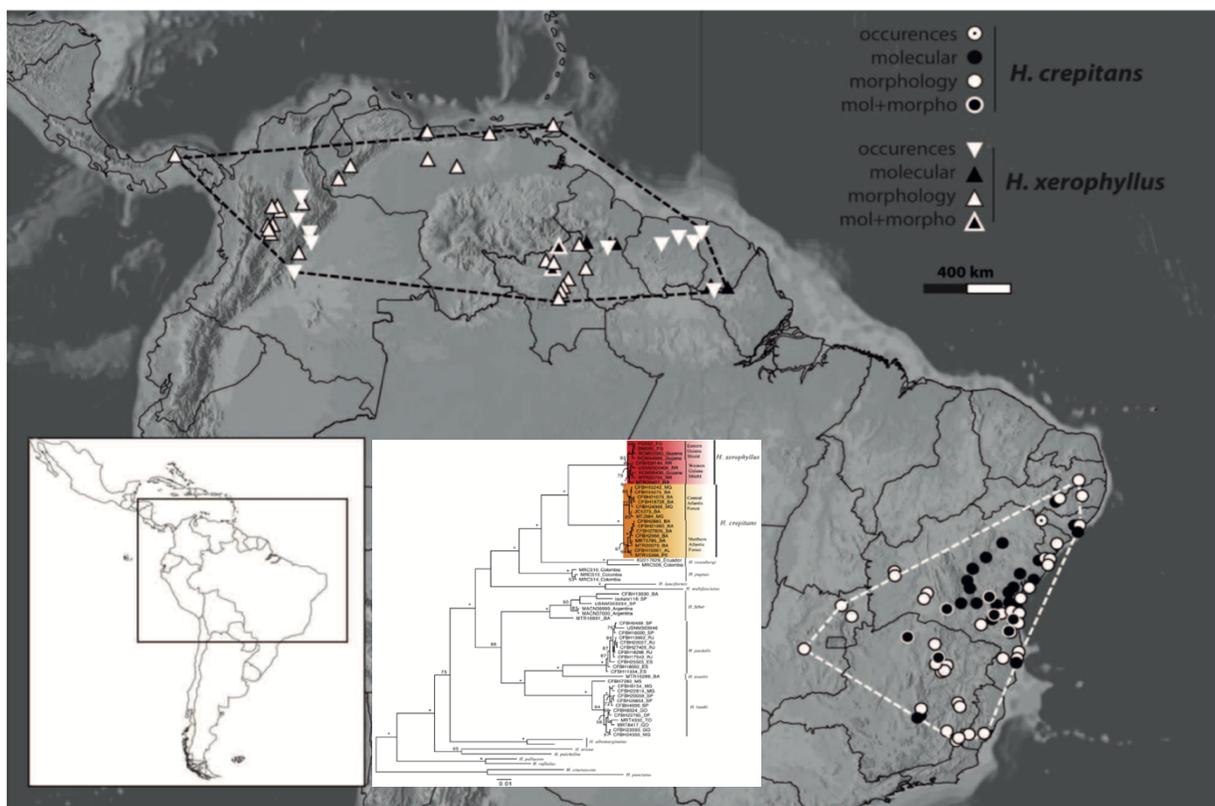
Aunque *B. xerophyllus* presenta una amplia distribución, esta especie está asociada a pequeños arroyos, lagos y estanques de agua (Orrico et al. 2017). Además, no es una especie de interior de bosque, y la fragmentación antrópica o los hábitats perturbados no parecen afectar sus poblaciones (Orrico et al. 2017); incluso, se le encuentra comúnmente asociada a lagos artificiales, zonas de cultivo o cerca de viviendas rurales (observaciones propias).

*Boana xerophyllus* está relacionada filogenéticamente con *B. crepitans* como su clado hermano, además de *B. rosenbergi* y *B. pugnax* como las especies filogenéticamente más cercanas (Orrico et al. 2017). A pesar de ser clados hermanos, *B. crepitans* y *B. xerophyllus* no se sobrelapan geográficamente. En Colombia *B. xerophyllus* se distingue fácilmente de *B. rosenbergi* por su distribución, acotada a la costa Pacífica, y porque presentan llamados con frecuencias más bajas (Kluge 1979). Asimismo, *B. pugnax* presenta tamaños corporales más grandes que *B. xerophyllus* y llamadas con frecuencias más bajas (Kluge 1979). Curiosamente, aunque se señala que estas especies tienen una distribución geográfica similar a lo largo del Valle del Magdalena, solo en algunas zonas de Colombia han sido encontradas en simpatria (Lynch & Suárez-Mayorga 2001; Acosta-Galvis 2012; Solano et al. 2015).

Históricamente, las poblaciones de *B. xerophyllus* de Colombia habían sido consideradas como *B. crepitans* (Kluge 1979; Orrico et al. 2017), a pesar de la gran distancia geográfica (más de 4000 km en línea recta) entre la localidad tipo de *B. crepitans* en Bahía, Brasil, y las poblaciones colombianas. Recientemente Orrico et al. (2017) dividieron a *B. crepitans* en dos taxa con base en análisis morfológicos y moleculares, retomando la sinonimia de *B. xerophyllus* y elevándola a especie. Los autores relacionaron filogenéticamente a *B. xerophyllus* con *B. crepitans* como su clado hermano, además de *B. rosenbergi* y *B. pugnax* como las especies más cercanas. La distribución de *B. crepitans* y *B. pugnax* en Colombia es prácticamente idéntica, salvo por diferencias en el rango de altitud, con poblaciones de *B. pugnax* solo en altitudes bajas (<1000 m). Asimismo, en algunas zonas de Colombia, *B. pugnax* y *B. xerophyllus* se distribuyen simpátricamente (Lynch & Suárez-Mayorga 2001; Acosta-Galvis 2012; Solano et al. 2015).

Por otro lado, Guarnizo et al. (2015) han resaltado la estructuración genética que existe en las poblaciones de *B. xerophyllus* en Colombia, destacando barreras geográficas importantes como la Cordillera Oriental, que ha limitado el flujo génico entre las poblaciones del centro del país asociadas a la vertiente occidental de la Cordillera Oriental y los llanos orientales. Lo anterior sugiere que debe revisarse la distribución de *B. xerophyllus*, para evaluar patrones filogeográficos y determinar si existen diferentes linajes al interior de su distribución.

A nivel genético-ómico, no existen trabajos que hayan evaluado la diversidad y estructura genética de *B. xerophyllus* a lo largo de su distribución. Tampoco se ha determinado si existe correlación entre aspectos genéticos con rasgos fenotípicos o ambientales, ya sea a escala del paisaje o en términos más históricos y filogeográficos.



**Figura 1.** Relaciones filogenéticas y distribución actual de *B. xerophyllus* y *B. crepitans*. El filograma indica las especies hermanas, *B. xerophyllus* en rojo y *B. crepitans* en amarillo. Tomado de Orrico et al. (2017). Los triángulos y círculos indican las poblaciones actuales de *B. xerophyllus* y *B. crepitans* respectivamente registradas para el análisis de Orrico et al. (2017).

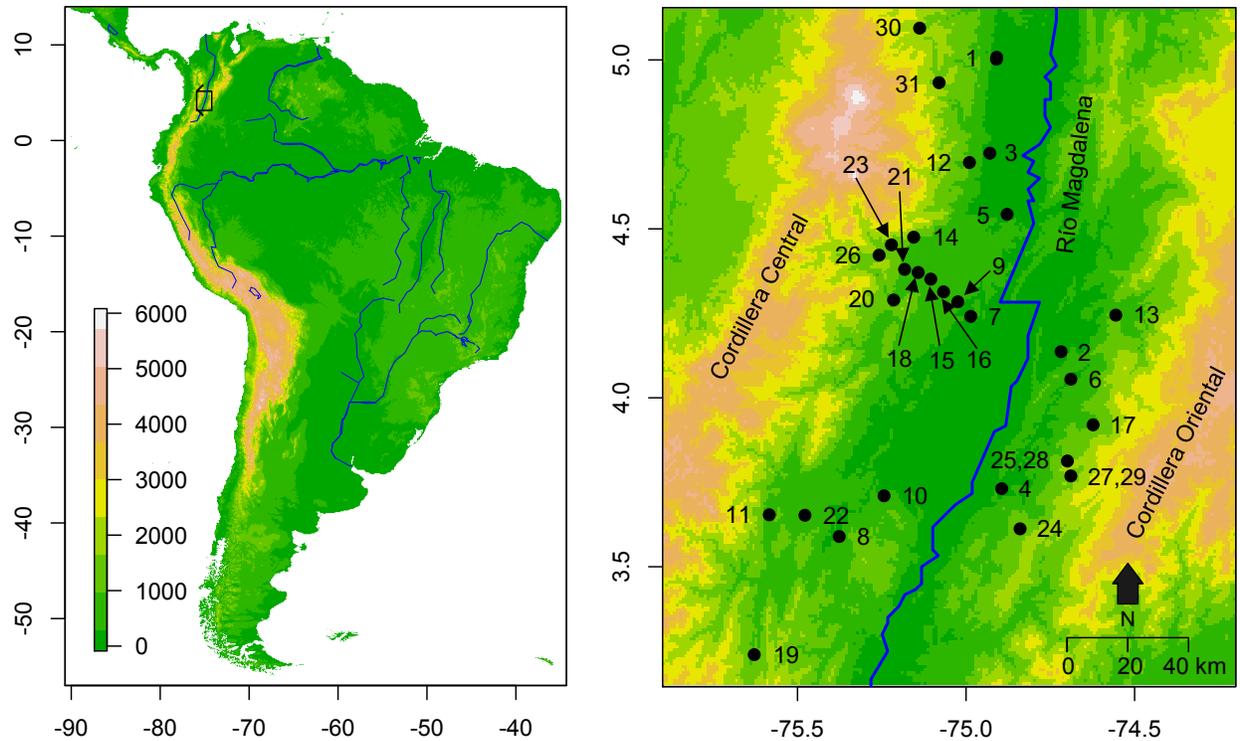
### Área de estudio

Se trabajó en 11 localidades del Departamento del Tolima (Colombia), donde se obtuvieron muestras de tejido, medidas morfológicas de 90 individuos y 59 registros acústicos individuales de *B.*

*xerophyllus* durante los años 2015, 2016 y 2017 (Tabla 1). Debido a que en general se obtuvo un tamaño de muestra bajo por población para el análisis de tamaño corporal, se tomaron datos de individuos del museo de la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima (CZUT) a lo largo del Valle del Magdalena (Tabla 1). Además, se delimitaron los datos por medio de rangos de altitud, es decir las muestras por abajo de los 500 metros (rango bajo), entre 501 y 1000 m (rango medio) y por encima de los 1000 m (rango alto).

**Tabla 1.** Muestras de *Boana xerophyllus* utilizadas para el análisis de llamadas y tamaño corporal. Las poblaciones están organizadas en: rango bajo por debajo de 500 metros, medio entre 501 y 1000 m y alto por encima de 1000 m. Se indica el número de muestras (N) y llamadas registradas en cada localidad. En color gris las localidades visitadas en este estudio, las otras localidades pertenecen a registros históricos de la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima (CZUT). La distribución espacial de las muestras se puede ver en la Figura 2.

Pob	Localidad	Rango	N	Llamadas	Latitud	Longitud	Cordillera	Altitud(m)
1	Armero	Bajo	15	7	5.0061	-74.9081	Central	285
2	Carmen de Apicalá	Bajo	2		4.1368	-74.7186	Central	322
3	Venadillo	Bajo	1		4.7239	-74.9292	Central	328
4	Prado	Bajo	15	7	3.7313	-74.8943	Oriental	380
5	Piedras	Bajo	1		4.5430	-74.8781	Central	383
6	Cunday	Bajo	2		4.0550	-74.6889	Oriental	397
7	Chicoral	Bajo	9	3	4.2455	-74.9857	Central	400
8	Ataco	Bajo	3		3.5893	-75.3762	Central	482
9	Gualanday	Medio	15	5	4.2839	-75.0242	Central	512
10	Coyaima	Medio	1		3.7098	-75.2432	Central	576
11	Chaparral	Medio	4		3.6523	-75.4779	Central	580
12	Venadillo	Medio	3		4.6963	-74.9900	Central	619
13	Icononzo	Medio	1		4.2446	-74.5559	Oriental	736
14	Ibagué	Medio	1		4.3451	-75.1064	Central	770
15	Picalaña	Medio	19	5	4.3451	-75.1064	Central	781
16	Tierracaliente	Medio	1	3	4.3449	-75.1053	Central	807
17	Cunday	Medio	2		4.5872	-74.5872	Oriental	832
18	Picalaña	Medio	8	4	4.3712	-75.1418	Central	885
19	Planadas	Medio	2		3.2398	-75.6283	Central	910
20	Rovira	Medio	1		4.2894	-75.2147	Central	940
21	Ibagué	Medio	2	9	4.3801	-75.1822	Central	952
22	Chaparral	Medio	1		3.6537	-75.5836	Central	1000
23	Ibagué	Alto	2	6	4.4753	-75.1553	Central	1140
24	Villarica	Alto	3		3.9199	-74.6232	Oriental	1181
25	Dolores	Alto	1		3.6121	-74.8396	Oriental	1207
26	Orquídeas	Alto	6	4	4.4224	-75.2584	Central	1283
27	Cunday	Alto	2		4.0534	-74.5872	Oriental	1441
28	Galilea	Alto	3	3	3.7688	-74.6892	Oriental	1455
29	Cunday	Alto	1		3.8128	-74.6993	Oriental	1553
30	Herveo	Alto	1		5.0940	-75.1377	Central	1573
31	Líbano	Alto	13	6	4.9325	-75.0800	Central	1670



**Figura 2.** Distribución espacial de las muestras de *Boana xerophyllus* utilizadas para el análisis de llamadas y tamaño corporal. Las poblaciones a la margen izquierda del río Magdalena pertenecen a la Cordillera Central y las de la margen derecha a la Cordillera Oriental. En las poblaciones 1, 4, 7, 9, 15, 18, 23, 25, 26, 28 y 31 se registraron las llamadas para el análisis acústico. Las poblaciones están organizadas de menor a mayor altitud (1-31, sucesivamente). Para una descripción detallada de las localidades y los rangos de altitud, ver la Tabla 1.

### Análisis morfológico

Para evaluar la asociación entre la variación morfológica y dos parámetros, el gradiente altitudinal y las barreras geográficas, se tomaron las siguientes nueve medidas comúnmente utilizadas en la taxonomía de Anuros: longitud hocico-cloaca (SVL, las abreviaturas están basadas en la literatura en inglés), longitud de la tibia (TL), distancia inter-orbital (IEC), distancia inter-nasal (IND), longitud del tercer disco de la pata anterior y cuarto de la pata posterior derecha (D3F y D4T respectivamente), diámetro horizontal del tímpano (WTIM), distancia entre el centro de la narina derecha y el borde anterior del ojo derecho (NE), y ancho de la cabeza medido justo detrás del tímpano (HW). Se realizaron dos procedimientos para la toma de medidas, primero por medio de fotografías de individuos colectados en campo; todas las fotos se tomaron con la misma cámara, a la misma distancia del individuo, y cada fotografía fue calibrada individualmente. Se utilizó el programa ImageJ v1.50i (Schneider et al. 2012). El valor de cada medida se obtuvo promediando tres mediciones de dicha variable en cada individuo. Segundo, se tomaron medidas de 96 individuos de *B. xerophyllus* de la Colección Zoológica de la Universidad del Tolima (CZUT). Todos los individuos fueron medidos por la misma persona con un calibrador digital Mitutoyo Absolute CD-

6"CSX (0.00mm); de igual manera el valor estimado se obtuvo del promedio de tres mediciones.

De los 96 individuos medidos de la CZUT, para análisis posteriores sólo se utilizaron aquellos que pudieron ser confirmados como machos y que se encontraban dentro de la distribución de estudio, basados en los registros de campo. Así, se seleccionaron 51 individuos distribuidos en 23 localidades a lo largo de un rango de 269 a 1675 m de altitud. Con ello, se obtuvo una matriz final para los análisis morfológicos con 141 individuos machos, clasificados en el rango de altitud bajo (48), medio (61) y alto (32).

Se evaluó la distribución normal de las nueve variables morfológicas, así como su posible autocorrelación debido a que se ha sugerido que las ranas presentan un crecimiento isométrico (Emerson 1978). Todas las medidas se analizaron bajo un modelo lineal general, y posteriormente se tomó el valor residual estandarizado para realizar la prueba de normalidad. Así, se seleccionaron siete variables (SVL, Res.HW, Res.IND, Res.IEC, Res.WTIM, Res.D3F, Res.D4T) para análisis de ANOVA, ANCOVA, MANOVA y análisis discriminante lineal (LDA); todo ello se realizó con el lenguaje de programación R v3.4.1 (R Core Team 2017) y los paquetes ggplot2 v2.2.1 (Wickham 2009), lattice v0.20-35 (Sarkar 2008) y mass v7.3-47 (Venables & Ripley 2002) bajo macOS Sierra v10.12.6.

### **Análisis acústico**

La llamada de anuncio (simplemente la llamada de aquí en adelante) es el tipo de llamada más reconocida en los anuros, la cual proporciona, tanto a las hembras como a los machos co-específicos, información sobre el tamaño, la posición e incluso la identidad del emisor (Narins et al. 2007). Las poblaciones de *B. xerophyllus* en el Departamento del Tolima se caracterizan por presentar un llamado corto similar a un gorjeo de baja frecuencia; este consistente en múltiples pulsos basado en la definición para hílidos de McLister et al. (1995), así como una frecuencia dominante y fundamental (diferencias de las frecuencias pueden verse en la Figura 3). Cabe resaltar que este llamado es modulado en la amplitud, pero no en la frecuencia.

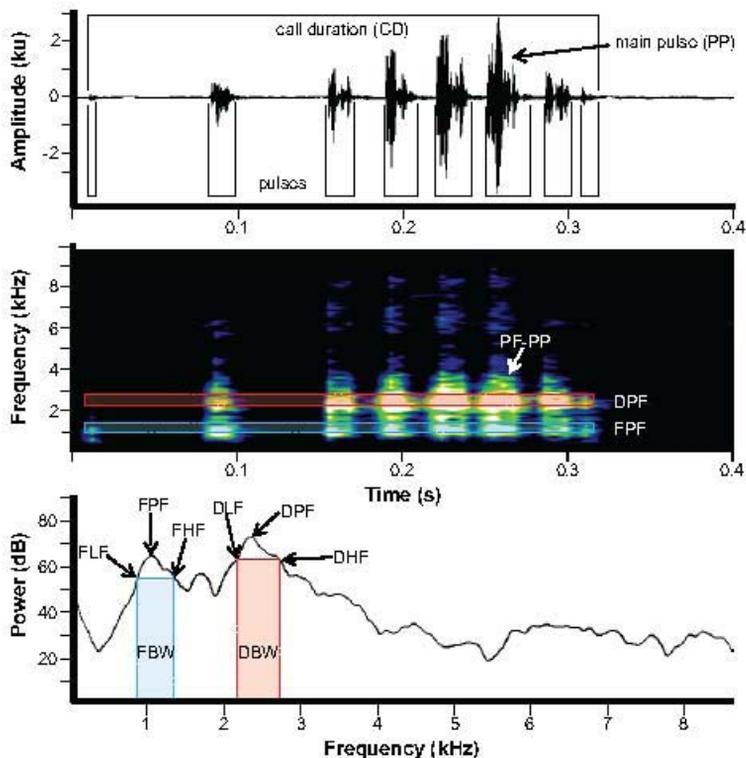
Debido a que los anuros pueden ajustar las características de sus llamadas dependiendo de los factores ambientales (Ey & Fischer 2009), solo se analizaron llamadas de poblaciones de *B. xerophyllus* registradas en lagos o pequeños ríos sin corriente y por lo menos a 200 metros de distancia de cualquier carretera o fuente de ruido abiótico. Además, el contexto en el que los anuros cantan (ver una mejor descripción en Wells, 2007, Capítulo 7), ya sea llamadas de alarma, de anuncio o agresivas (Narins et al. 2007), también produce variación, por lo que solo se registraron machos que no presentaran ningún tipo de interacción con hetero- o co-específicos. Por lo tanto, las llamadas grabadas fueron espontáneas. Se analizó un total de 183 llamadas de 61 individuos, clasificados bajo el mismo criterio de rangos de altitud utilizado para la morfología (17 llamadas de rango bajo, 16 medio y 28 alto). 3 de estas llamadas pertenecían a la localidad de Galilea (Tabla 1) y fueron donadas por el Grupo de Herpetología, Eco-fisiología y Etología (GHEE) de la Universidad del Tolima. Las grabaciones se hicieron con un micrófono supercardio Audio-Technica AT897 acoplado a un boompole K-Tek KE-89CC en una grabadora Tascam DR-100. Considerando que los anfibios son ectotermos y dependen de la temperatura ambiente para regular su metabolismo, se

registró la temperatura del aire con un termo-higrómetro RH 101 Extech IR. Las llamadas fueron analizadas por medio del programa Raven v1.5 (The Cornell Lab of Ornithology 2014) a 44,1 kHz y 16 bits. Todas las medidas espectrales se analizaron con una rápida transformación de Fourier bajo el algoritmo de Blackman a 724 muestras de la onda y una red de frecuencias DFT de 2048. Finalmente, los 18 parámetros acústicos analizados fueron una combinación de 14 parámetros espectrales y 4 temporales, los cuales se describen en la Tabla 2 y Figura 3.

Se comprobó la distribución normal de los 18 parámetros acústicos. Asimismo, todas las variables se analizaron bajo un modelo lineal general debido a la dependencia entre la temperatura y los parámetros de la llamada (Narins et al. 2007; Wells 2007b). Se obtuvo el valor residual estandarizado de la regresión, el cual se utilizó en los análisis. Posteriormente, se seleccionaron nueve variables acústicas (Res.NoP, Res.CD, Res.PF, Res.Freq95%, Res.DPF, Res.PF-PP, Res.DHF, F-BW, Call%), eliminando así la alta multicolinealidad y la no normalidad de algunas variables espectrales, para finalmente realizar diferentes pruebas univariadas (ANOVA, ANCOVA) y multivariadas (análisis discriminante lineal, MANOVA) entre los rangos de altitud.

**Tabla 2.** Parámetros espectrales y temporales analizados de las llamadas de *B. xerophyllus*.

<b>Parámetro</b>	<b>Descripción</b>
NoP	Número de pulsos por llamada
CD	Duración de la llamada en segundos
DPF	Frecuencia pico, en otros estudios reportada como frecuencia dominante
DLF	Frecuencia más baja de la frecuencia dominante
DHF	Frecuencia más alta en la frecuencia dominante
DBW	Ancho de banda de la frecuencia dominante, calculado como la diferencia entre DHF y DLF
IQR-BW	Ancho de banda Inter-cuartiles, tomado como la diferencia entre las frecuencias en el primer y tercer cuartil en la frecuencia dominante
Freq95%	Frecuencia al 95% de la frecuencia pico
BW90	Ancho de banda al 90% de la frecuencia pico o dominante
Call%	Porcentaje de duración de los pulsos por llamada. Este parámetro está dado por la diferencia entre la duración de todos los pulsos menos y los intervalos de silencio entre pulsos
PF-PP	Frecuencia pico del pulso principal
D-PP	Duración del pulso principal
FPF	Frecuencia pico fundamental, en otros estudios reportada como frecuencia fundamental
FLF	Frecuencia más baja de la frecuencia fundamental
FHF	Frecuencia más alta en la frecuencia fundamental
F-BW90	Ancho de banda al 90% en la frecuencia fundamental
FBW	Ancho de banda de la frecuencia fundamental, calculado como la diferencia entre FHF y FLF
F-IQR-BW	Ancho de banda Inter-cuartiles de la frecuencia fundamental



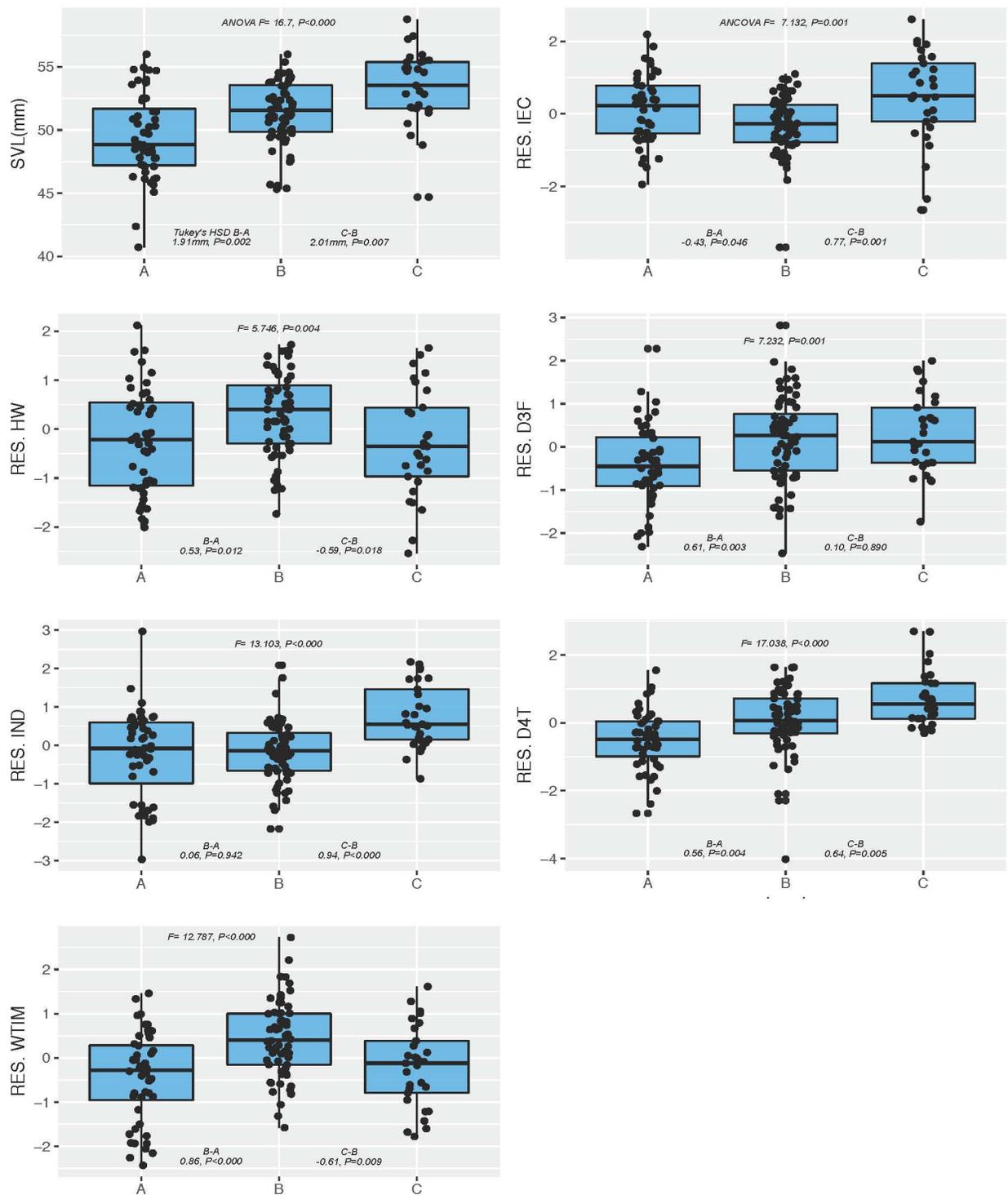
**Figura 3.** Representación de la forma de la onda y el espectro acústico de la llamada de *B. xerophytus* en la localidad de Orquídeas. Se indican algunas medidas que se tomaron para el análisis acústico; la definición de las variables se detalla en la Tabla 2. En la parte superior se puede observar cómo se contabilizaron el número de pulsos (para este caso fueron ocho), la duración de la llamada (alrededor de 0.3 segundos) y como se seleccionó el pulso principal. En el centro se resaltan la frecuencia dominante en color rojo (DPF), la frecuencia fundamental en azul (FPF) además del pulso principal. En la parte superior la Transformación de Fourier bajo el algoritmo de Blackman para medir los parámetros espectrales.

## Resultados

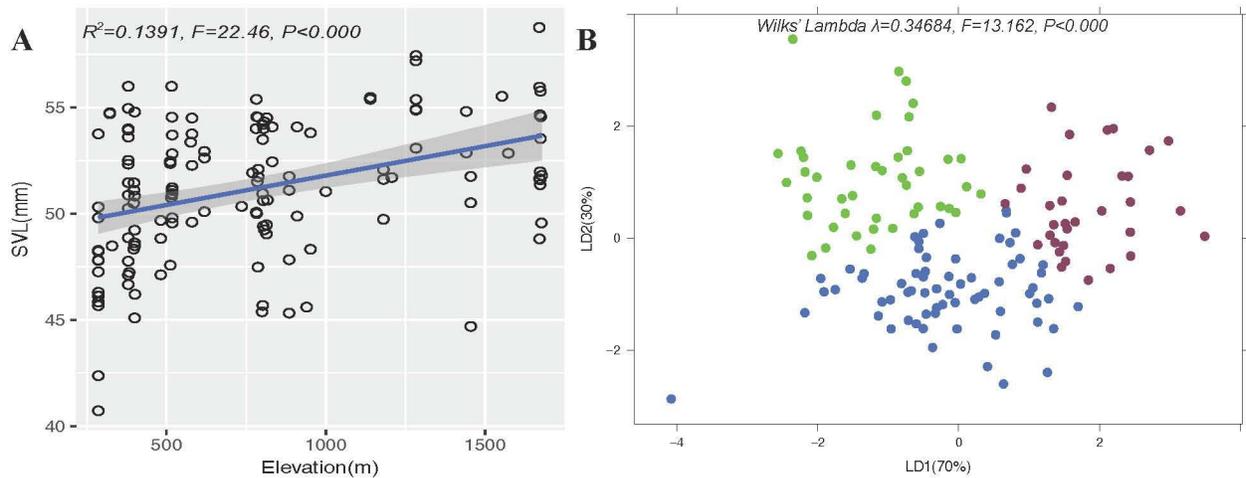
Las variables morfológicas se redujeron a siete con base en el resultado de autocorrelación con el tamaño del cuerpo. Los análisis de varianza entre rangos altitudinales indicaron que cada una de las siete variables se separara entre rango bajo, medio o alto ( $P < 0.00$ , Fig. 4), basados en pruebas de significancia honesta de Tukey HSD.

La longitud hocico-cloaca (SVL), una medida ampliamente usada en los estudios con anuros debido a que permite diferenciar la condición de desarrollo (juveniles y adultos) y corporal (macho débil o macho fuerte), además de ser utilizada para determinar dimorfismo sexual en muchas especies, fue altamente significativa entre rangos altitudinales (ANOVA  $F=16.7$ ,  $P < 0.000$ ). Lo anterior muestra que las poblaciones se diferencian por el patrón clinal ( $A < B < C$ , Tabla S1). Los resultados mostraron que existe una diferencia de 1.91mm (Tukey's HSD,  $P=0.002$ ) entre el rango de altitud medio y bajo, y de 2.01mm ( $P=0.007$ ) entre rango medio y alto. Así, las poblaciones de rango bajo también son diferentes en tamaño respecto a las de rango alto (3.92mm, Tukey H KSD,  $P < 0.000$ ).

Respecto a las variables morfológicas y el patrón clinal, los resultados de correlación fueron significativos entre la altitud y la SVL ( $R^2=0.1391$ ,  $F=22.46$ ,  $P < 0.000$ ) (Fig. 5A); este patrón fue más evidente ( $\Delta=0.34684$ ,  $F=13.162$ ,  $P < 0.000$ ) cuando se evaluaron las siete variables morfológicas combinadas con el análisis discriminante morfológico (ADM) (Fig. 5B). Aunque el ADM separó los rangos de altitud en tres grupos discretos bien definidos (Fig. 5B), se observó una clasificación errada para 33.3% de los individuos de rango bajo, mientras que para los de rango medio y alto fue 24.6% y 18.8%, respectivamente.



**Figura 4.** Variación morfológica de *B. xerophyllus* a lo largo del gradiente de altitud. A=rango bajo (<500m), B=rango medio (501-1000), C=rango alto (>1001). Las variables RES. IEC, RES. HW, RES. D3F, RES. IND, RES. D4T y RES. WTIM es el valor residual de la autocorrelación con la SVL. Todas las variables morfológicas indicaron diferencias significativas ( $P < 0.00$ ) entre las poblaciones de rango bajo y rango medio o alto. Ver análisis morfológico para la descripción de las variables.

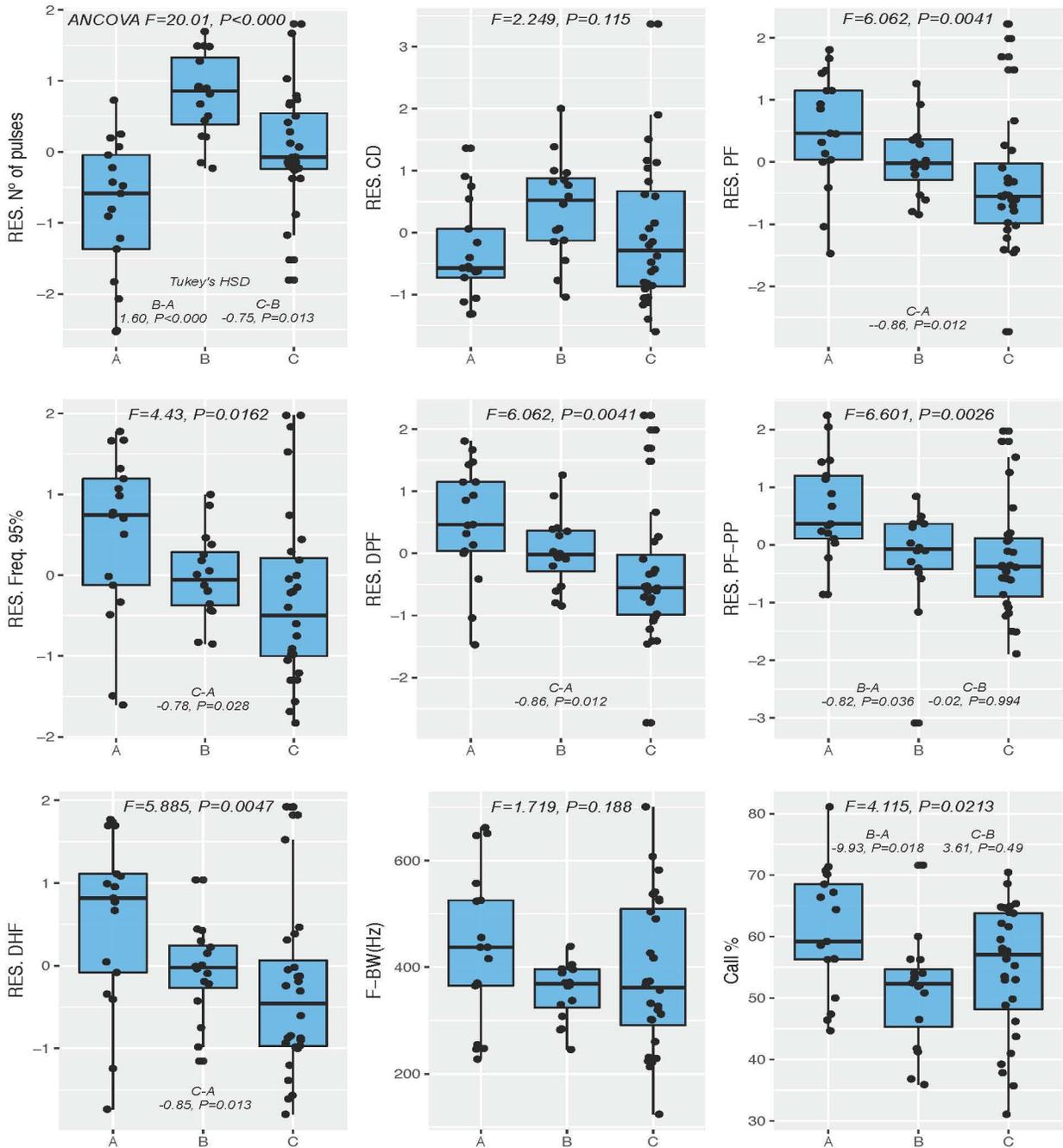


**Figura 5.** Patrón clinal de variación morfológica de *B. xerophyllus* a lo largo del gradiente de altitud. A) Relación positiva entre la longitud hocico-cloaca (SVL) y la altitud. B) Análisis discriminante morfológico de siete variables morfológicas. Se indica el rango altitudinal: rango bajo (verde), rango medio (azul), rango alto (púrpura). Ver análisis morfológico para la descripción de las variables.

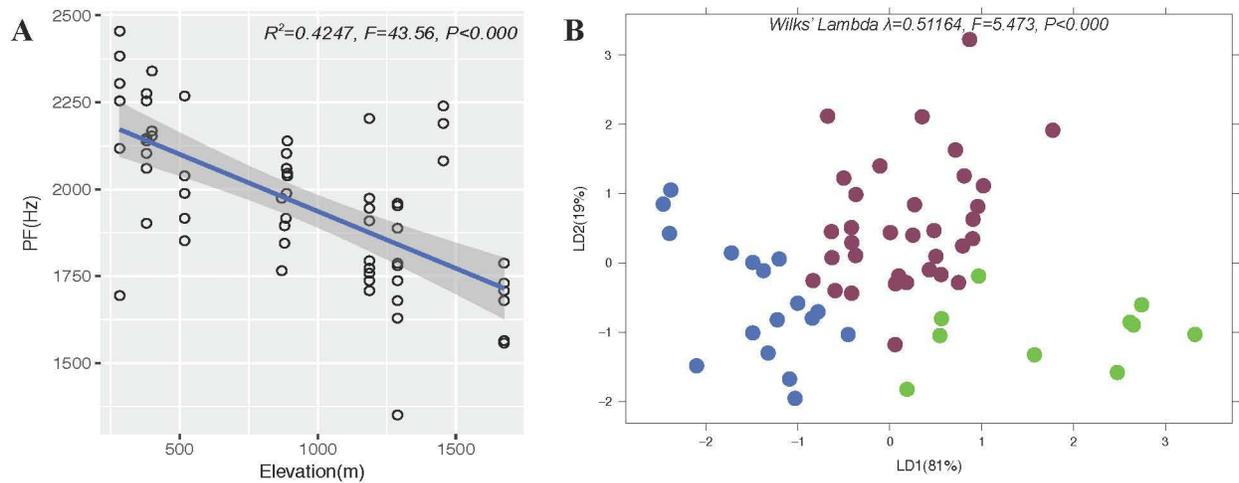
De la misma forma que el análisis morfológico, después de reducir las variables acústicas a nueve (tres temporales y seis espectrales) y controlar el efecto de la temperatura sobre éstas, se encontró que la temperatura no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de duración de los pulsos por llamada (Call%) ni el ancho de banda (F-BW), los resultados de pruebas univariadas mostraron que los valores residuales de la frecuencia pico, la frecuencia al 95%, la frecuencia pico dominante, la frecuencia pico del pulso principal y la frecuencia más alta en la frecuencia pico (RES.PF, RES. Freq. 95%, RES. DPF, RES. PF-PP y RES. DHF, respectivamente) presentaron una relación negativa en relación con el rango altitudinal (Fig. 6). Además, el valor residual del número de pulsos por llamada y el porcentaje de duración de los pulsos por llamada (RES. NoP y Call%, respectivamente) también fueron diferentes entre rangos. Es decir, existe un menor número de pulsos entre las poblaciones de rango bajo con un promedio de 7 pulsos ( $\pm 2$ ) respecto a las de rango alto 10 ( $\pm 2$ ) y medio 11 ( $\pm 1$ ) ( $A < C < B$ , Tabla S2). Asimismo, se observó que el Call% en de las poblaciones de rango bajo fue mayor comparado con las de rango medio, aunque no hubo diferencias significativas con respecto al rango alto ( $A > B = C$ , Fig. 6). A pesar de la diferencia entre la duración promedio de las llamadas entre rangos ( $0.17 \text{ s} \pm 0.05$ ,  $0.25 \pm 0.05$  y  $0.27 \pm 0.08$ , rango bajo, medio y alto respectivamente), después de corregir el efecto de la temperatura, no se observaron diferencias significativas en la duración de la llamada (RES. CD, Fig. 6).

Las variables espectrales RES. PF, RES. Freq95, RES. DPF, RES PF-PP y RES. DHF mostraron un patrón clinal (Fig. 6), aunque sólo se encontraron diferencias estadísticas entre las poblaciones de rango bajo y alto. Contrario al patrón clinal morfológico, el patrón clinal respecto a la frecuencia pico o de mayor intensidad de la llamada (PF) fue negativo (Fig. 7A), con valores entre rangos bajo, medio y alto diferentes ( $2.18 \text{ kHz} \pm 0.18$ ,  $1.99 \text{ kHz} \pm 0.13$  y  $1.82 \pm 0.20$ , respectivamente). Teniendo en cuenta la variación observada en el tamaño corporal entre los rangos bajo, medio y alto, se observó en general un patrón clinal similar para la combinación de parámetros temporales y

espectrales en la llamada (Fig. 7B). El ADA mostró que los rangos altitudinales se separan de forma similar al ADM ( $\lambda=0.51164$ ,  $F=5.473$ ,  $P<0.000$ ; Fig. 7B). Sin embargo, se obtuvo una relación inversa entre las poblaciones de rango medio y rango alto (Fig. 7B). Asimismo, el ADA mostró una mayor varianza en la dispersión de los datos (Fig. 7B) y una clasificación de individuos menos adecuada, donde el 47.1% de los individuos de rango bajo resultaron mal clasificados, al igual que el 31.3% y 21.4% para los de rango medio y alto, respectivamente.



**Figura 6.** Variación acústica de *B. xerophyllus* a lo largo de un gradiente de altitud. A=rango bajo (<500 m), B=rango medio (501-1000), C=rango alto (>1000). Todas las variables son el residuo estandarizado de la correlación con la temperatura. Ver Tabla 2 para la descripción de los parámetros.



**Figura 7.** Patrón clinal de variación acústica de *B. xerophyllus* a lo largo del gradiente de altitud. A) Relación negativa entre la frecuencia pico (PF) y la altitud. B) Análisis discriminante acústico (ADA) de 4 variables acústicas (2 temporales RES. NoP y Call%, y 2 espectrales RES. PF y RES. FRE95). Se indica el rango altitudinal: rango bajo (verde), rango medio (azul), rango alto (púrpura). Ver Tabla 2 para la descripción de las variables.

## Discusión

El patrón clinal positivo en el tamaño corporal de los machos de *Boana xerophyllus* encontrado para las poblaciones estudiadas en el Departamento del Tolima, Colombia, es el primero reportado para esta especie. Así, se confirmó la predicción propuesta de que los individuos de *B. xerophyllus* aumentan de tamaño a medida que ocurren a mayor altitud (Fig. 5). Las poblaciones de *B. xerophyllus* también mostraron variación acústica a lo largo del gradiente altitudinal, con un patrón clinal negativo para los parámetros espectrales. Este resultado también es acorde a la hipótesis planteada y corresponde con una respuesta pleiotrópica negativa sobre la frecuencia dominante, por efecto del aumento en el tamaño corporal a lo largo del gradiente altitudinal.

Los tamaños corporales documentados en este trabajo para los machos de *B. xerophyllus* del rango medio y alto ( $51.5 \text{ mm} \pm 2.6$  y  $53.2 \pm 3$ , respectivamente) son similares a lo reportado por Duellman (1970) para Panamá (54.5), Kluge (1979) para Panamá y Colombia (53 y 55, respectivamente), Bernal et al. (2004) en Colombia (53.4) y Orrico et al. (2017) para Colombia, Venezuela, Brasil, Panamá y Trinidad (50.6). Por otro lado, el tamaño de las poblaciones de rango bajo aquí reportados ( $49.5 \pm 3.4$ ) son los de menor tamaño para toda la distribución de *B. xerophyllus*. Cabe mencionar que se ha reportado que los patrones clinales en ranas pueden ser diferenciales respecto al sexo y el estado de desarrollo de los individuos (Hsu et al. 2014). Por lo tanto, no puede descartarse que el patrón clinal encontrado en *B. xerophyllus* esté ligado al sexo dado que solo se consideraron individuos machos. Aunque la variación fenotípica geográfica no es un resultado nuevo para *B. xerophyllus*, hasta este estudio no se había documentado el patrón clinal a lo largo de gradientes de altitud en esta especie. Por ejemplo, Kluge (1979) encontró que en las poblaciones de *B. xerophyllus* en Colombia, tanto machos como hembras, eran significativamente más pequeñas en diferentes medidas corporales (por ejemplo diámetro del tímpano, longitud hocico-cloaca y ancho de la cabeza) que las de Panamá. No obstante, no reportan la altitud de los ejemplares medidos, por lo que no se puede descartar que las diferencias pudieran deberse a variación fenotípica clinal. Por otro lado, Duellman (1970) y Orrico et al. (2017) también reportaron variación intraespecífica en tamaño corporal entre sexos, lo que indica dimorfismo sexual en las poblaciones de esta especie. Bernal et al. (2004) analizaron específicamente poblaciones de *B. xerophyllus* en el Departamento del Tolima, quienes describen el tamaño corporal y algunos parámetros acústicos, aunque no de forma estadística. Así, el presente trabajo es el único que ha determinado de forma sistemática la variación morfológica de *B. xerophyllus* a lo largo de un gradiente altitudinal, y que muestra una fuerte relación positiva ( $R^2=0.139$ ,  $P<0.001$ ) entre la diversificación del tamaño corporal y la altitud.

En relación con las llamadas, Bernal et al. (2004) reportan una frecuencia dominante (frecuencia pico en adelante) de 0.35 kHz, un valor inusual y muy por debajo del valor de frecuencia pico encontrado en este estudio de 1.82 kHz ( $\pm 0.20$ ) de los individuos del rango alto. Asimismo, las frecuencias pico de 0.9-1.28 reportada por Duellman (1970) son diferentes a aquellas que presenta *B. xerophyllus* en los tres rangos altitudinales (1.82, 1.99 y 2.18 kHz, respectivamente). Sólo la frecuencia reportada por Kime et al. (2000) para poblaciones de Panamá (2.15 kHz) es similar a la del rango alto, lo que puede sugerir que los datos reportados por Kime et al. (2000) fueran de poblaciones de rangos altitudinales elevados.

Los parámetros temporales fueron altamente variables y dinámicos, similar a lo reportado para otras

especies de hílidos (Gerhardt 1991). La duración de la llamada y el número de pulsos a lo largo de la clina altitudinal estuvo entre 0.17 - 0.27 s, y 7-11 pulsos, respectivamente; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas en la duración de la llamada después de controlar por el efecto de la temperatura. Esto indica un efecto positivo de la clina altitudinal sobre la duración de la llamada (duración de la llamada rango bajo < medio < alto). La divergencia en parámetros temporales puede ser explicada debido a que individuos más grandes pueden presentar una mayor capacidad pulmonar (Blair 1972). Por lo tanto, un efecto pleiotrópico positivo al tener un tamaño corporal mayor se reflejaría en la duración de la llamada y en un número de pulsos mayor. Esta hipótesis también ha sido sugerida en *Dendropsophus labialis*, una especie de rana de alta montaña (2500 - 3500 m). Con ella Luddecke & Sanchez (2002) experimentalmente probaron que sus llamadas duran más en poblaciones de mayor altitud y que disminuyen la duración a medida que la temperatura aumenta. Además, estas ranas también presentan el mismo patrón clinal positivo respecto al tamaño corporal que *B. xerophyllus*. Aunque en este trabajo no se realizó una manipulación de las temperaturas, la evidencia sugiere que la misma respuesta fisiológica a condiciones más frías podría estar ocurriendo con las poblaciones de *B. xerophyllus*.

Como se mencionó previamente, *B. xerophyllus* presenta menos pulsos (NoP) en las llamadas de individuos de rango bajo respecto a las de rango alto y medio, pero con un mayor porcentaje de llamada (Call%) en el rango bajo, esto aún después de corregir el efecto de la temperatura. Por lo tanto, aunque las poblaciones de rango bajo presentan un número menor de pulsos en sus llamadas, quizás debido a una menor capacidad pulmonar, como se ha sugerido con otros hílidos en Colombia (Luddecke & Sanchez 2002), también presentan menos intervalos silenciosos (determinado a través de la diferencia entre la duración de la llamada menos Call%) a diferencia de las poblaciones de rango medio y alto. Es decir, que independientemente de la duración de la llamada, las poblaciones de rango bajo presentan más pulsos por unidad de tiempo y estos duran más tiempo con respecto a las poblaciones de rango medio y alto.

Aunque no se midió la tasa de pulsos en este trabajo, las diferencias significativas en el número de pulsos y no en la duración de la llamada entre rangos, sugiere que la tasa de pulsos puede estar variando de la misma forma. En efecto, la tasa de pulsos ha sido probada como un factor de elección de pareja por parte de las hembras en otros hílidos, Gerhardt (1991) propuso que los parámetros dinámicos, por ejemplo la duración de la llamada, el número de pulsos y la tasa de pulsos, entre otros, permiten a las hembras discriminar entre individuos heteroespecíficos y co-específicos. Además, históricamente se ha sugerido que los patrones clinales de variación en la llamada pueden ayudar a entender el aislamiento reproductivo en anuros (Narins & Smith 1986), por lo que futuros estudios deberían explorar el impacto de la diversificación fenotípica en la elección de pareja en *B. xerophyllus*.

Las llamadas de anuncio y las medidas morfológicas en las poblaciones de rango bajo presentaron una alta varianza, como se aprecia por el mayor error de clasificación del análisis discriminante morfológico y del análisis discriminante acústico (33.3% y 47.1%, respectivamente). Ello sugiere que tanto la morfología como el llamado parecen estar más limitados a medida que las poblaciones ocurren a una mayor altitud. Asimismo, que la variación fenotípica en las poblaciones de rango bajo es amplia e incluso podría haber diferencias entre poblaciones del mismo rango.

Desde que Kluge (1979) exploró los patrones de variación fenotípica geográfica de *B. crepitans* entre las poblaciones de Panamá y Colombia, con respecto a las poblaciones de la localidad tipo en Brasil, se sugirió que tanto las poblaciones de Centroamérica y la parte norte de Sudamérica eran una especie diferente a las de Brasil. El reciente trabajo de Orrico et al. (2017) confirmó esta hipótesis a través de marcadores moleculares y evidencia morfológica, por lo que revivieron la sinonimia de *B. crepitans* y nombraron como *B. xerophyllus* a las poblaciones de Centroamérica y el norte de Sudamérica. Dada la incertidumbre sobre la taxonomía de este género, así como la poca información sistemática sobre parámetros acústicos y morfológicos para *B. xerophyllus* (Orrico et al. 2017), podemos indicar algunos de los varios vacíos en investigación más urgentes: primero, es necesario un trabajo sistemático sobre la diversificación morfológica y acústica de *B. xerophyllus* a lo largo de toda su distribución. La limitada información metodológica publicada por Duellman (1970), Kime et al. (2000) y Bernal et al. (2004) solo permite comparaciones poco concluyentes. Segundo, ¿cuál es el papel evolutivo de la diversificación fenotípica de *B. xerophyllus*? Se ha sugerido que, en los patrones clinales, la heterogeneidad espacial puede promover selección divergente y consecuente diversificación fenotípica adaptativa (Savolainen et al. 2007; Sobel et al. 2010; Savolainen et al. 2013). Sin embargo, la diversificación fenotípica también puede ser producto de apareamiento selectivo (Egger et al. 2008; Elmer et al. 2009; Dreher & Pröhl 2014) o desplazamiento ecológico de caracteres (Stuart & Losos 2013; Kerschbaumer et al. 2014), por lo que es necesario evaluar los patrones y procesos de la diversificación fenotípica de *B. xerophyllus*. Tercero, ¿puede la divergencia acústica ocasionar que los individuos de diferentes poblaciones no se reconozcan, llevando esto a un proceso de especiación incipiente? En general, la divergencia acústica (Doebeli 2005; Boul et al. 2007; Reynolds & Fitzpatrick 2007) o la combinación de preferencias acústicas, y otros factores fenotípicos como el color (Dreher & Pröhl 2014; Twomey et al. 2014), han sido asociados con procesos tempranos de especiación en ranas. La variación tanto en aspectos temporales (duración y número de pulsos) como espectrales (frecuencia) de la llamada de *B. xerophyllus*, es un interrogante abierto. Aunque en otras especies de ranas como *Hyla versicolor*, se sabe que las hembras prefieren llamadas largas sobre llamadas cortas (Gerhardt et al. 2000), pero además se ha sugerido que la duración puede ser un indicador de 'buenos genes' (Doty & Welch 2001); el papel evolutivo de la elección femenina en *B. xerophyllus* es un tópico importante para futuras investigaciones.

Finalmente, el papel adaptativo climático de la variación en tamaño corporal ha sido contradictorio en anfibios (Ashton 2002; Krizmanic et al. 2005; Laugen et al. 2005; Olalla-Tárraga & Rodríguez 2007; Adams & Church 2008). No obstante, el tamaño del cuerpo tiene un papel fundamental en las interacciones ecológicas, fisiológicas y de historia de vida de los organismos (Barbault 1988). Para el caso específico de *B. xerophyllus*, los resultados apoyan consistentemente que, por lo menos dentro de la zona de estudio en el Departamento del Tolima, los machos sí presentan un patrón clinal de mayor tamaño a mayor altitud, por lo que pueden explorarse hipótesis adaptativas para probar el desempeño del tamaño corporal bajo las condiciones climáticas encontradas (ranas pequeñas a mayor temperatura y ranas grandes a menor temperatura) en la clina altitudinal.

## Conclusiones

Este es el primer trabajo que analiza de forma sistemática los patrones de variación fenotípica de *Boana xerophyllus* a lo largo de un gradiente altitudinal. Los resultados indican que existe un patrón clinal con una relación positiva entre el tamaño corporal y la altitud con un efecto pleiotrópico negativo sobre las características espectrales en la llamada de *B. xerophyllus*; es decir, que los individuos son más grandes y presentan una frecuencia más baja a medida que habitan a una mayor altitud. Por otro lado, la diferenciación de los aspectos temporales como el número de pulsos y la duración de la llamada, también pueden ser producto de un efecto pleiotrópico debido al aumento en la capacidad pulmonar por efecto de la clina altitudinal.

Tanto los análisis acústicos como los morfológicos mostraron una diferenciación y diversificación de los rasgos fenotípicos a lo largo de los rangos altitudinales. Es necesario continuar con trabajos de investigación para esclarecer el papel adaptativo o no de la diversificación fenotípica de *B. xerophyllus*, por lo que es fundamental obtener más datos sistemáticos de la relación del fenotipo de *B. xerophyllus* y variables ambientales, ecológicas y evolutivas a lo largo de toda su distribución geográfica.

## **CAPÍTULO II**

### **Evolución y estructura genómica de *Boana xerophyllus* en el Departamento del Tolima (Colombia)**

## Introducción

La variación fenotípica puede ser adaptativa o no, dependiendo de las fuerzas que estén actuando, ya sea selección natural (Soria-Carrasco et al. 2014; Marques et al. 2016; Mazzarella et al. 2016) o deriva (Verdu et al. 2009), respectivamente. Un nuevo campo que permite explorar cómo se relacionan las fuerzas microevolutivas con el ambiente o con el fenotipo son las 'ómicas', las cuales han impactado en todas las áreas de las ciencias básicas y aplicadas.

Cabe mencionar que los anfibios son el grupo de vertebrados que menos se ha trabajado bajo la perspectiva 'ómica'. Con tres órdenes, Anura (ranas), Caudata (Salamandras) y Gymnophiona (Cecilias), y 7,842 especies (amphibian species of the world; AmphibiaWeb, 2018), sólo existen cinco genomas publicados para anfibios. El primero en 2010 para la especie *Xenopus tropicalis* (Hellsten et al. 2010), cinco años después, el segundo para *Nanorana parkeri* (Sun et al. 2015) y los más recientes para *Xenopus laevis* (Session et al. 2016), *Lithobates catesbeiana* (Hammond et al. 2017) y *Ambystoma mexicanum* con 32Gb de genoma (Nowoshilow et al. 2018). Gran parte de este rezago en recursos genómicos está dado por la amplia variación en los tamaños del genoma en anfibios (Gregory 2003). Esta variación va desde poco menos de 1Gb para la rana australiana *Limnodynastes ornatus* hasta más de 110Gb en la salamandra *Necturus punctatus* (Gregory 2017); (Hidalgo et al. 2017).

A pesar de los pocos genomas de referencia en anfibios, ello no ha sido impedimento para que se incrementen los trabajos genómicos basados en secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés), con técnicas como la representación reducida del genoma (RRLs por sus siglas en inglés). Una técnica de RRLs ampliamente utilizada es la secuenciación de marcadores asociados a sitios de restricción (RAD-seq, Miller et al. 2007), la cual combina enzimas de restricción que cortan el ADN en pequeños fragmentos irregulares, produciendo así cientos de miles de éstos a lo largo del genoma. Posteriormente, los fragmentos son secuenciados en secuenciadores de alto rendimiento (Davey et al. 2011; Jiang et al. 2016) para obtener millones de lecturas aleatorias a lo largo del genoma. Por ello, las secuencias pueden venir tanto de regiones bajo selección (genes) como neutrales (Manel & Holderegger 2013; Hall & Beissinger 2014). Finalmente, para poder hacer inferencias acerca de la evolución de las especies, ha sido necesario el desarrollo en paralelo de recursos computacionales que permiten ensamblar genomas *de novo* (Baker 2012). Ello ha sido fundamental para poder aplicar la genómica a estudios que buscan entender cómo actúan las fuerzas microevolutivas en organismos no modelo.

En anfibios, se ha aplicado RAD-seq para detectar señales de hibridación y diversificación (Streicher et al. 2014; Bell et al. 2015), en filogeografía y genómica de poblaciones (Thomé & Carstens 2016; McCartney-Melstad et al. 2017), para entender y determinar las bases genéticas asociadas al sexo (Lambert et al. 2016) y su evolución (Brelsford et al. 2016). También en sistemática, filogenómica y delimitación de especies (Barrow et al. 2014; Chan et al. 2017), así como en genómica del paisaje para determinar la conectividad funcional (Grummer & Leaché 2017) y señales de adaptación en ranas (Guo et al. 2016).

En genómica del paisaje uno de los objetivos es la posibilidad de rastrear no solo loci neutrales, sino aquellos sujetos a selección que pueden correlacionarse con factores ambientales (Holderegger et al. 2006; Hall & Beissinger 2014). Así, la variación genética espacial y ambiental, trabajan bajo el supuesto de que las poblaciones geográficamente cercanas comparten un mayor flujo génico y, por lo tanto, poca diferenciación poblacional, lo que Wright (1943) llamó “aislamiento por distancia” (APD). Sin embargo, a medida que los paisajes presentan una configuración más compleja, el APD puede dejar de covariar linealmente entre la estructura génica y la heterogeneidad del paisaje (Wang & Bradburd 2014). Además, los patrones de APD no necesariamente están definidos por la estructura del paisaje *per se*. La combinación de factores intrínsecos (fisiología, comportamiento, morfología,) y extrínsecos (competencia, interacciones depredador-presa, disponibilidad de alimento) no asociados a la heterogeneidad del paisaje, se relacionan con patrones de dispersión de las especies, lo que puede generar estructura poblacional sin correlación con APD; o por el contrario, puede acentuar la relación (Aguillon et al. 2016).

Por otro lado, las poblaciones naturales independientemente de la distancia espacial, también pueden correlacionarse genéticamente a través de patrones ambientales, lo que se conoce como “aislamiento por ambiente” (APA, Wang & Bradburd 2014). Aunque el APA puede llevar a procesos adaptativos, el APA en sí no implica adaptación debido a que otros factores como sesgos en la dispersión, preferencias de hábitat, exclusión competitiva o selección contra migrantes, también pueden llevar a patrones de APA (Wang & Bradburd 2014).

Así, en genómica del paisaje se utilizan cada vez con mayor frecuencia métodos que detectan señales espaciales de adaptación local por correlación ambiental. Estos métodos, basados en enfoques frecuentistas o bayesianos, analizan la composición genética a través de frecuencias alélicas o medidas de diferenciación como  $F_{st}$  (Savolainen et al. 2013), que se correlacionan con diferentes factores ambientales a través de análisis de asociación genómico-ambiental (Rellstab et al. 2015). Por lo que con estos métodos se han documentado asociaciones genómicas del nicho ambiental en los maíces perennes Teosintes (Aguirre-Liguori et al. 2017), correlación fenotípica y adaptación al clima en *Anolis* (Rodríguez et al. 2017), adaptación local ambiental en frijoles (Rodríguez et al. 2015), adaptación local en árboles (De Kort et al. 2014) y aves bajo flujo génico (Termignoni-García et al. 2017) y señales de adaptación climática en ranas (Guo et al. 2016).

Aunque cada vez es mayor el número de estudios en genómica del paisaje, organismos no modelo y potencialmente sensibles a la heterogeneidad ambiental como los anfibios en bioregiones altamente heterogéneas como los Andes Tropicales o Tumbes-Chocó-Magdalena, son relevantes para comprender procesos de adaptación local a nivel paisajístico. Por lo tanto, paisajes de transición entre bioregiones que conectan ecosistemas distintos como el bosque seco tropical y el bosque húmedo tropical, son buenos modelos para comprender el impacto de estos en la adaptación local climática y la diversificación fenotípica. Asimismo, evaluar efectos de barreras geográficas y ambientales sobre la estructura génica poblacional. Para probar esto, este trabajo utiliza poblaciones de una rana neotropical (*Boana xerophyllus*) a lo largo de un gradiente altitudinal (ambiental) que va desde el bosque seco tropical hasta el bosque húmedo tropical.

## Objetivos

### Objetivo general

- Determinar la estructura genética poblacional de la rana *Boana xerophyllus* y evaluar su correlación con patrones de variación morfológica, ambiental y potencialmente adaptativa, en gradientes altitudinales y en alopatria a lo largo de su distribución en el Departamento del Tolima (Colombia)

### Objetivos específicos

- Determinar la diversidad y estructuración genética de las poblaciones de *B. xerophyllus*
- Determinar si existe correlación entre divergencia morfológica, ambiental y genética en las poblaciones de *B. xerophyllus*
- Identificar si *B. xerophyllus* presenta loci candidatos a selección climática a lo largo del gradiente de altitud

## Hipótesis

**H1.** Las poblaciones de *Boana xerophyllus* en el Departamento del Tolima (Colombia) presentarán estructuración (diferenciación) genética asociada con barreras geográficas y con el gradiente altitudinal, lo que se reflejará en un patrón de aislamiento por ambiente, particularmente en los loci sujetos a selección

**H2.** Los patrones de variación en el tamaño corporal estarán correlacionados con la estructura genética poblacional

### Predicciones

- La estructuración genética poblacional de *B. xerophyllus* será mayor en poblaciones con mayor distancia ambiental (temperatura) en el gradiente altitudinal, y también en aquellas separadas por el río Magdalena comparadas con las poblaciones de una misma Cordillera
- La asociación entre aislamiento por ambiente y los patrones genéticos de *Boana xerophyllus* se reflejará en la presencia de loci candidatos a selección climática a lo largo del gradiente de altitud
- La estructura genómica se asociará entre poblaciones con tamaños corporales diferentes

## Materiales y métodos

### Diversidad mitocondrial y relaciones filogenéticas

Una primera aproximación para determinar efectos adaptativos e inferir la estructura genética, es la reconstrucción de las relaciones evolutivas. Por ello, en primer lugar, se determinaron las relaciones filogenéticas entre los individuos de las especies estudiadas. Se obtuvieron un total de 113 muestras de tejido a partir de pequeños cortes de los discos de las patas en once poblaciones de *B. xerophyllus* y cuatro de *B. pugnax* (Tabla 3, Fig.8). Se extrajo el ADN genómico por medio del kit de sangre y tejido QIAGEN DNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA); las extracciones se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento. Inicialmente se amplificó el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I* (COI:628pb) para verificar la identificación morfológica de los individuos. Se usaron los primers COIChmf4 (5'TYT CWA CWA AYC AYA AAG AYA TCG G3') y COIChmr4 (5'ACY TCR GGR TGR CCR AAR AAT CA3') (Che et al. 2012). El PCR fue llevado a un volumen final de 25µL que contenía 0.75µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1.5µL de dNTPs (2mM), 0.2µL de Taq DNA polimerasa, 0.4µL de cada primer (10µM), y 1µL de muestra. El protocolo de amplificación consistió de una denaturación inicial de 5min a 95°C, 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 46°C, 1min a 72°C, y una extensión final de 10min a 72°C. El producto de PCR fue enviado a secuenciar en Macrogen Inc., Korea). Las muestras se secuenciaron bidireccionalmente para minimizar posibles errores de lectura. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, editadas, alineadas y revisadas visualmente, utilizando MUSCLE (Edgar 2004), bajo parámetros estándares implementados en Geneious v7.1.9 (Kearse et al. 2012).

Para los análisis filogenéticos se utilizaron 102 secuencias homólogas del gen COI de otras especies del género, obtenidas de GenBank (Tabla S4). Para enraizar los árboles se utilizaron como grupo externo seis secuencias de *Dendropsophus microcephalus*, incluyendo dos nuevas de Purificación A y cuatro del Departamento de Santander (Colombia) publicadas por Guarnizo et al. (2015). Con base en el alineamiento final, se eligió el mejor modelo de sustitución nucleotídica de acuerdo al Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC) con JModelTest v2.1.10 (Darriba et al. 2012), usando las opciones por defecto (11 esquemas de sustitución, ML optimizado y NNI). El mejor modelo bajo ambos parámetros fue HKY+I+G con proporción de sitios invariables estimada de 0.5410 y gamma de 1.0690.

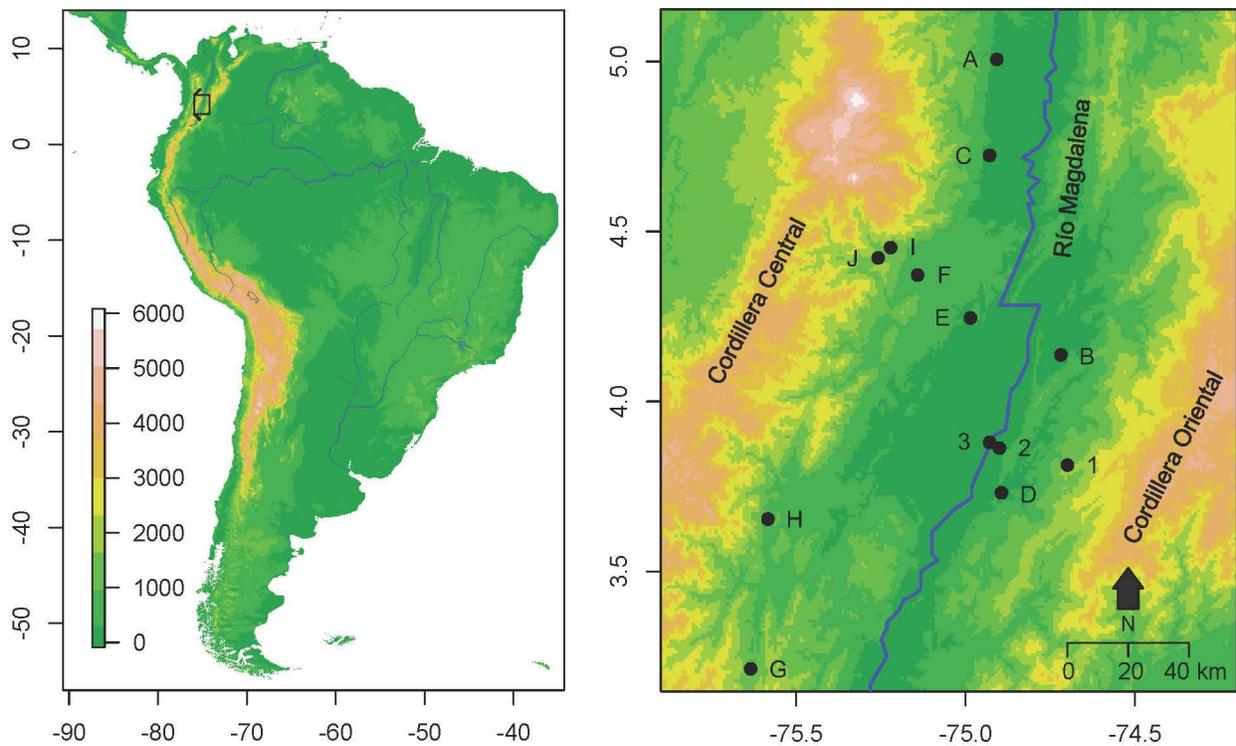
Se estimaron las relaciones filogenéticas con el modelo de inferencia bayesiana con MrBayes v3.5 (Ronquist et al. 2012), con 20 millones de generaciones, en cuatro cadenas de Markov (una fría) a una temperatura de 0.2 y muestreadas cada 20,000 generaciones utilizando el modelo de sustitución descrito anteriormente. Para determinar la convergencia de las cadenas se utilizó el programa Tracer v1.6.0 (Rambaut et al. 2014) y para la reconstrucción de clados se consideró una probabilidad posterior igual o mayor a 0.95. También se utilizó el modelo de máxima verosimilitud, con RAxML v8.2.4 (Stamatakis 2014), con base en una búsqueda heurística de 10,000 repeticiones y 1,000 pseudoreplicas de bootstrap. La edición de los árboles obtenidos se hizo con FigTree v1.4.2 (Rambaut 2014).

Asimismo, se calculó una matriz de distancias genéticas pareadas no corregidas con MEGA v7 (Kumar et al. 2016), bajo un modelo K2P con 1,000 pseudoreplicas de bootstrap. Se realizó también

una red de haplotipos con el programa PopART v1.7 (Leigh & Bryant 2015), utilizando la opción Median Joining Network sin épsilon. Se estimaron los siguientes índices de diversidad genética en DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas 2009): sitios polimórficos, número de haplotipos, diversidad nucleotídica y la tasa de mutación.

**Tabla 3.** Muestras de las especies *Boana xerophyllus* y *B. pugnax* utilizadas para secuenciación del gen mitocondrial COI y para el genotipado por secuenciación (GBS). Las poblaciones de *B. xerophyllus* están organizadas de menor a mayor altitud (A-J, sucesivamente), en color gris las poblaciones de rango bajo, en azul rango medio y en blanco rango alto. Se indica el número de muestras (N) por población, la altitud de las muestras en metros (Alt) y la temperatura promedio (Tem) en grados centígrados obtenida de WorldClim v1.4. En las poblaciones A y D se encontraron en simpatria ambas especies. Las muestras de *B. xerophyllus* de la población 1 solo se utilizaron para el gen COI y no para GBS. La distribución espacial de las muestras se puede ver en la Fig. 8.

Pob	Especie	Localidad	Latitud	Longitud	Cordillera	Alt(m)	Tem(°C)	N
A	<i>B. xerophyllus</i>	Armero	5.0061	-74.9081	Central	285	27.3	12
	<i>B. pugnax</i>							3
B	<i>B. xerophyllus</i>	Carmen de Apicalá	4.1368	-74.7186	Oriental	322	27.3	2
C	<i>B. xerophyllus</i>	Venadillo	4.7239	-74.9292	Central	328	27.1	1
D	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	3.7313	-74.8943	Oriental	380	27.5	15
	<i>B. pugnax</i>							1
E	<i>B. xerophyllus</i>	Chicoral	4.2455	-74.9857	Central	400	27.4	6
F	<i>B. xerophyllus</i>	Picaleña	4.3718	-75.1418	Central	887	23.9	4
G	<i>B. xerophyllus</i>	Planadas	3.2134	-75.6347	Central	977	23.8	1
H	<i>B. xerophyllus</i>	Chaparral	3.6538	-75.5837	Central	1030	24.2	2
I	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	4.4525	-75.2215	Central	1187	21.4	13
J	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	4.4224	-75.2584	Central	1289	20.3	15
1	<i>B. xerophyllus</i>	Dolores	3.8128	-74.6993	Oriental	1551	19.2	4
2	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	3.8629	-74.9001	Oriental	278	27.8	11
3	<i>B. pugnax</i>	Purificación B	3.8795	-74.9292	Central	289	27.8	5



**Figura 8.** Distribución espacial de las muestras de *Boana xerophyllus* y *B. pugnax* utilizadas para secuenciación del gen mitocondrial COI y para el genotipado por secuenciación (GBS). Las poblaciones están organizadas de menor a mayor altitud (A-J, sucesivamente). Las poblaciones de rango bajo son de la A-E, rango medio F y G y rango alto H-J. La población 1 es de la especie *B. xerophyllus*, aunque solo se utilizó para secuencias del gen COI. Las poblaciones a la derecha del río Magdalena pertenecen a la Cordillera Oriental, incluida la población 2 (*B. pugnax*). A la izquierda del río Magdalena pertenece a la Cordillera Central, incluida la población número 3 (*B. pugnax*). En las poblaciones A (Armero) y D (Prado) se encontraron poblaciones de *B. xerophyllus* y *B. pugnax* en simpatria. Para ver una descripción detallada de las poblaciones consultar la Tabla 3.

### Procesamiento de datos genómicos y llamado de SNPs

Para la obtención de datos genómicos se hizo una selección de 95 muestras de diez poblaciones de *B. xerophyllus* y 4 de *B. pugnax* (Tabla 3, Fig.8). Las muestras de *B. pugnax* se utilizaron debido a que se encontraron en simpatria con *B. xerophyllus* en dos localidades (A y D: Fig. 8), además de ser la única especie encontrada en las salidas de campo de las localidades 2 y 3 (Fig. 8). Aunque este trabajo se centra en *B. xerophyllus*, se utilizaron las muestras de *B. pugnax* para secuenciación del gen COI y GBS debido a: 1) el bajo número de muestras de *B. xerophyllus* y 2) la posibilidad de evaluar hibridación entre ambas especies, teniendo en cuenta la simpatria y cercanía filogenética. No obstante, la segunda opción se descartó durante el llamado de los SNPs debido a que se utilizó la opción de genética de poblaciones del programa RADToolKit v0.13.10 (Ke Bi, Computational Genomics Resource Laboratory [CGRL], University of California, Berkeley), esta opción hace un llamado de SNPs por separado entre especies, por lo que no existe homología entre loci. Las 95 muestras fueron digeridas con la enzima de restricción Lambda DNA/*HindIII* Marker (Invitrogen,

Carlsbad, CA). Posteriormente se comprobó la calidad del ADN por medio de visualización en gel de agarosa (1%). Se determinó la concentración de ADN a 60ng/μl a través de cuantificación fluorométrica con Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA), valor requerido para el procesamiento de NGS. Se envió una placa con 95 muestras aleatorizadas al Genomics facility, Institute of biotechnology, Cornell University, donde llevaron al cabo el genotipado por secuenciación o GBS (Elshire et al., 2011), con la enzima *EcoT22I* con sitio de reconocimiento 5'-ATGCA/T-3' y 3'-T/ACGTA-5', en un secuenciador Illumina Hi-seq2500 que típicamente produce lecturas de alrededor de 100pb en una sola dirección (single-end por sus siglas en inglés).

Se realizó un ensamble *de novo* para las especies *B. xerophyllus* y *B. pugnax* por separado, utilizando RADToolKit v0.13.10 (Ke Bi, Computational Genomics Resource Laboratory [CGRL], University of California, Berkeley), el cual permite hacer un procesamiento de datos crudos ('raw data'), identificando loci putativos para inferir haplotipos de cada individuo. Los pasos para el procesamiento y obtención final de los datos de polimorfismos de un solo nucleótido (de aquí en adelante SNPs, por sus siglas en inglés) se describen en la Tabla 4 (los parámetros se detallan en la Tabla S3 de los anexos). Es importante resaltar que RADToolKit presenta dos opciones para hacer el llamado de SNPs, la primera para análisis filogenómicos y la segunda para genética de poblaciones, la cual utiliza los pasos PopRad y ANGSD (ver Tabla 4 para descripción de los parámetros). La opción para genética de poblaciones fue la utilizada en este trabajo, por lo que el llamado de SNPs se hizo por separado para *B. xerophyllus* y *B. pugnax*.

**Tabla 4.** Procesamiento de datos crudos y ensamble *de novo* con RADToolKit. Los parámetros detallados se pueden ver en la Tabla S3 de los anexos.

<b>Preclean</b>	Consiste en tomar los archivos crudos y separar las secuencias por individuos en archivos fastq.gz para después crear una métrica de calidad de los archivos crudos a través del programa fastQC v0.11.5 (Andrews 2010).
<b>Demultiplex</b>	Crea un directorio que contiene las muestras crudas, más un archivo índice que contienen los barcodes de cada muestra; en esta opción también se determina el tipo de librerías con que se construyeron los datos (ej. single-end o paired-end) y si se va a permitir algún "mismatch" (para el caso de este análisis ninguno).
<b>Filter</b>	Es clave definir la enzima utilizada y el sitio de corte, en este caso fue ATGCA para la enzima <i>EcoT22I</i> (5'-ATGCA/T-3'), sin "mismatch" para el sitio de reconocimiento.
<b>CleanSE</b>	Utiliza el programa Bowtie2 v2.3.1 (Langmead & Salzberg 2012) para alinear los reads con genomas de referencia de organismos como bacterias y humanos, debido a que son fuentes comunes de contaminación (Singhal 2013). Seguido de esto se utilizaron los programas Trimmomatic v0.36 (Bolger et al. 2014) y Skewer v0.2.1 (Jiang et al. 2014) para limpiar los adaptadores y hacer filtrados de calidad de las bases.
<b>Clustertest</b>	Prueba diferentes umbrales de agrupamiento individual y entre individuos para escoger el o los más óptimos para la construcción de contigs.
<b>Contig</b>	Reconstrucción de RAD loci para cada individuo.
<b>PopRad</b>	Concatena RADs de todas las muestras para hacer una referencia, después hace una alineación usando Bowtie2 y finalmente un realineamiento de indels y filtrado de SNPs con GATK v3.7 (Mckenna et al. 2010).

---

<b>ANGSD</b>	Llamado de genotipos, llamado de SNPs y estimación de la frecuencia de los alelos utilizando ANGSD (Korneliussen et al. 2014).
--------------	--

---

## Estructura genética poblacional

Para determinar la estructura genética de las poblaciones y explorar diferentes valores de  $K$  (número de grupos genéticos), con base en los SNPs obtenidos, se utilizaron dos métodos bayesianos. Primero con fastSTRUCTURE v1.0 (Raj et al. 2014) que modifica la estructura bayesiana del programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) al no utilizar el algoritmo Gibbs Sampler, obteniendo así un mayor rendimiento para calcular los grupos genéticos. Se corrió con las opciones por defecto, bajo el contenedor para programas Docker v17.03.0-ce (Merkel 2014) con dockerbiotools/fastStructure; se probaron valores de  $K$  de 1 a 10 (1 a 4 para *B. pugnax*) y se utilizó el algoritmo chooseK para múltiples elecciones de los valores de  $K$  incluidos en el programa. Los resultados se graficaron en un diagrama de barras. El segundo método fue el disponible en el programa BAPS v6.0 (Corander et al. 2013), con parámetros por defecto, bajo la opción de análisis de poblaciones mezcladas sin poblaciones predefinidas, ni coordenadas geográficas; el resultado se visualizó en un diagrama de barras.

Otra forma de estimar grupos genéticos (estructura) es por medio de análisis de componentes principales (PCA), en donde se asume que la variación genética es continua a lo largo de los ejes. Así, los individuos que tienen valores equivalentes se agrupan debido a ancestría similar, mientras que los individuos que tienen una mayor proporción de mezcla genética aparecen como puntos continuos entre grupos (Patterson et al. 2006; Ma & Amos 2012). Este análisis se hizo con pcadapt en R v3.0.4 (Luu et al. 2017), utilizando parámetros de datos faltantes, muestras mezcladas, y sin información *a priori* sobre las poblaciones. El programa hace correcciones basadas en un valor umbral <5% para la frecuencia del alelo menos común (MAF por sus siglas en inglés) y, a diferencia de otros PCA, utiliza la distancia de Mahalanobis en lugar de distancia euclidiana. Este procesamiento se realizó de la misma forma para *B. xerophyllus* y *B. pugnax*.

Posteriormente, se creó un nuevo data set con un valor de MAF (<5%) con el paquete para R adegenet v2.1.1 (Jombart & Ahmed 2011) para ambas especies. Este parámetro es fundamental cuando se realizan detecciones de loci candidatos a selección y estudios de asociación del genoma (Balding 2006). Se estimó de nuevo la estructura genética poblacional con el programa sNMF v2.0 (Frichot et al. 2014) como una función del paquete LEA v2.0 en R (Frichot & François 2015). sNMF calcula coeficientes de ancestría individual bajo un modelo de verosimilitud, con un algoritmo que genera una matriz de factorización dispersa no negativa (sNMF por sus siglas en inglés) para individuos mezclados. Asimismo, sNMF tiene un mejor desempeño cuando las poblaciones pueden presentar una alta probabilidad de endogamia y cuando hay muchos genotipos faltantes (Frichot et al. 2014). Por lo tanto, se escogió sNMF para estimar las proporciones de agrupamiento genético (estructura) basado en los coeficientes de ancestría. Los parámetros utilizados fueron 100,000 iteraciones con 10 repeticiones, 8 CPU, ploidía 2,  $K$  de 1 a 10, y se calculó la entropía cruzada. Se eligió el valor del  $K$  óptimo a través del promedio de mínima entropía cruzada para cada una de las  $K$ ; las dos mejores proporciones de ancestría fueron graficadas con el paquete LEA en R.

Finalmente, se estimó una genealogía de máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) en RAxML v8.2.4 con el total inicial de 34,030 SNPs, con 1,000 búsquedas heurísticas y 500 pseudoreplicas de bootstrap, y el modelo GTR. Se hizo además un análisis de inferencia Bayesiana (BI, por sus siglas en inglés) con MrBayes v3.5, bajo el mismo modelo de sustitución, con 15 millones de generaciones. La convergencia de las cadenas se determinó con Tracer; ambos resultados se graficaron con FigTree.

### **Detección loci candidatos a selección, asociación genómica climática y fenotípica, y aislamiento por ambiente**

Debido a la ausencia de genomas de referencia que permitieran determinar la identidad de loci candidatos a selección y su papel evolutivo, se utilizaron tres enfoques para detección y asociación de loci candidatos a selección. Esto con el fin de tener mayor confianza en la detección de los loci outliers.

Primero se utilizó PcAdapt, que permite la detección de loci candidatos utilizando componentes principales, y corrige con  $MAF < 5\%$ . Este método ha demostrado ser más eficiente para evitar la falsa detección de loci “outliers” (FDR por sus siglas en inglés) y cuando los individuos son altamente mezclados; puede además manejar datos faltantes (Luu et al. 2017). Se utilizó un modelo con  $K=3$  y los resultados se graficaron con gráficas de Manhattan e histogramas de frecuencias de valores de  $P$ . Se estimaron los SNPs outlier con el paquete qvalue v2.8.0 (Bass et al. 2015) en R bajo dos umbrales ( $\alpha < 0.05$  y  $< 0.001$ ).

El segundo análisis fue con el programa BayeScan v2.1 (Foll & Gaggiotti 2008) que utiliza las frecuencias alélicas para estimar la probabilidad posterior de escenarios con o sin selección, a través de un modelo mixto de cadenas de Markov y simulaciones de Montecarlo. Debido a su estructura bayesiana, BayeScan tiene poco sesgo estadístico cuando se tienen pocas muestras (Foll & Gaggiotti 2008). No obstante, se ha sugerido que este método puede tener una alta tasa de falsos outlier (FDR) y poco poder estadístico cuando las poblaciones están muy mezcladas (Luu et al. 2017). El programa se corrió bajo línea de comando en macOS Sierra v10.12.6 con los siguientes parámetros para la cadena: 50,000 iteraciones, 20 de intervalo de thinning, número de corridas piloto 20 con 10,000 de longitud, un burnin de 100,000; los parámetros del modelo se dejaron por defecto. Para determinar la convergencia de las cadenas se utilizó el paquete coda v0.19-1 (Plummer et al. 2006) y los resultados se graficaron con ggplot2 v2.2.1 en R (Wickham 2009).

Para el análisis de asociación genómica climática (EAA por sus siglas en inglés), primero se obtuvieron las 19 variables bioclimáticas de WorldClim v1 (Hijmans et al. 2005) con base en las coordenadas de cada una de las muestras de *B. xerophyllus* y *B. pugnax*, con el paquete para R raster v2.5-8 (Hijmans et al. 2005). A continuación, se redujo el número de variables y se eliminó la multicolinealidad con un análisis de componentes principales (PCA) a dos grupos de variables asociadas a temperatura y precipitación, respectivamente. El primer componente de las variables de temperatura fue tomado como variable independiente que resume la contribución de los once parámetros (bio1 a bio11) de temperatura de BioClim. Este se estandarizó al dividir cada muestra por la desviación estándar, el cual se utilizó como covariable en el EAA.

Los análisis de asociación genómica climática y el de asociación genómica fenotípica (EAA) se corrieron con el programa LFMM (Frichot et al. 2013). El LFMM está basado en factores latentes mixtos y, además de detectar loci outlier candidatos a selección, permite correlacionar las frecuencias alélicas con otras variables con análisis de regresión con base en algoritmos bayesianos. Asimismo, permite explorar escenarios de adaptación local, al corregir factores como estructura poblacional, antecedentes genómicos y aislamiento por distancia, que podrían confundir la asociación ambiental (Frichot & François 2015). Para este análisis también se usó el paquete LEA y  $MAF < 5\%$ , con corrección de missing data con la función *impute* que se basa en el  $K$  óptimo (estructura poblacional) obtenido con sNMF; así, reemplaza los missing data con las frecuencias genotípicas ancestrales (para una mejor explicación del método de imputación ver Balding 2006). Ello permitió una mejor estimación del número de SNPs outliers correlacionados con el ambiente y con la longitud hocico-cloaca (SVL, ver análisis morfológico del Capítulo I para la descripción de la variable). Se corrió el LFMM con  $K=1-10$ , 100,000 iteraciones (ciclos del algoritmo de Gibbs Sampler) con 10 repeticiones, 8 CPU, 50% de burnin y, como covariables, el primer componente estandarizado de la temperatura y la SVL transformada logarítmicamente pero no estandarizada. Para determinar el número de loci outliers se construyó un histograma de frecuencias de los valores de  $P$  obtenidos, así como una gráfica tipo Manhattan. Se estimó la significancia con  $q$ value bajo diferentes umbrales ( $<1$ ,  $<0.1$ ,  $<0.05$ ,  $<0.025$ ,  $<0.01$ ,  $<0.001$  y  $<0.0001$ ).

Para determinar si la asociación genómica climática y la asociación genómica fenotípica pudieran estar sesgadas por el método o ser producto de una correlación espuria, se corrieron dos análisis con LFMM. Los parámetros fueron los mismos descritos previamente, pero como covariable, se utilizó un único valor de temperatura (3.030012659) y de SVL (1.7188). Este fue tomado de forma aleatoria entre todas las muestras. La significancia se estimó con  $q$ value bajo diferentes umbrales ( $<1$ ,  $<0.1$ ,  $<0.05$ ,  $<0.025$ ,  $<0.01$ ,  $<0.001$  y  $<0.0001$ ).

Aunque la asociación genómica de loci outlier correlacionados con variables ambientales (temperatura) sugiere adaptación climática, esto no es un indicador de aislamiento por ambiente (APA). APA puede ser incluso detectado en loci no sujetos a selección, si estos se asocian a sesgos de dispersión, exclusión competitiva o preferencias de hábitat (Wang & Bradburd 2014). Por lo tanto, para determinar si las poblaciones de *B. xerophyllus* presentan un patrón de APA o aislamiento por distancia (APD), se utilizó una estimación bayesiana de la diferenciación de alelos por estructura espacial-ecológica local (BEDASSLE por sus siglas en inglés) con el paquete BEDASSLE v1.5 (Bradburd et al. 2013) en R. Este determina la contribución relativa de la distancia ecológica o ambiental ( $\alpha_E$ ) y la distancia geográfica ( $\alpha_D$ ) sobre una medida de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) como covarianza de un conteo de alelos. BEDASSLE genera una tasa ( $\alpha_E/\alpha_D$ ) utilizando un algoritmo bayesiano a través de cadenas de Markov MCMC. Esta permite determinar la contribución ecológica al controlar la covarianza con la distancia geográfica para así evaluar el papel y la magnitud de factores ecológicos en la diferenciación genética entre poblaciones (Bradburd et al. 2013). Así, valores superiores a uno indican APA, y por debajo APD. Antes de correr el programa, se construyó una matriz de distancias geográficas pareadas entre las 10 poblaciones, ello a través de la distancia euclidiana entre las coordenadas geográficas de los sitios de muestreo y como distancia ecológica o ambiental el primer componente obtenido de WorldClim. La matriz posteriormente fue transformada a logaritmo natural. Para la construcción de la matriz de diferenciación genéticas, se crearon dos dataset. El primero con los SNPs candidatos a selección que fueron la totalidad de los

outliers compartidos y no, encontrados por los diferentes métodos (pcadapt, BayeScan, LFMM-climático y LFMM-fenotípico) bajo un umbral  $<0.01$ . El segundo con loci neutrales tomados de forma aleatoria, con el mismo número y frecuencia que los SNPs candidatos. Ambos dataset, fueron transformados a través de PGDSpider (Lischer & Excoffier 2012) para obtener un conteo de alelos y el tamaño de las muestras, archivos necesarios para que BEDASSLE determine a diferenciación genética entre poblaciones. El programa se corrió para cada alelo con los dos dataset (candidatos y neutrales) y una réplica para cada alelo bajo el modelo  $\beta$ -binomial, con 10 millones de generaciones, con una frecuencia de muestreo cada 200 y se eliminó el 50% de las cadenas como burnin. Para evaluar el desempeño del modelo, se visualizaron las tasas de aceptación de las MCMC (Fig. S3 y S4) y las gráficas trace, como lo sugiere Bradburd et al. (2013). Los resultados de este análisis se visualizaron en graficas de densidad y de cajas por medio de los paquetes ggplot2 en R. Por otro lado, se calculó el índice de fijación ( $F_{st}$ ) como una medida de diferenciación genética entre las diez poblaciones pareadas utilizando los mismos dataset de SNPs (neutrales y outliers) del análisis con BEDASSLE. Para esto, se utilizó el método de Weir & Cockerham (1984) bajo los paquetes para R Hierfstat v0.04-22 (Goudet 2005) y adegenet v2.1.1 (Jombart & Ahmed 2011).

Finalmente tanto los scripts, programas y sus respectivas versiones, secuencias y datos genómicos filtrados, serán depositados en repositorios tipo DRYAD y NCBI, dependiendo de las especificaciones de la revista de publicación. Esto con el fin de contribuir con la transparencia y la reproducibilidad en la investigación.

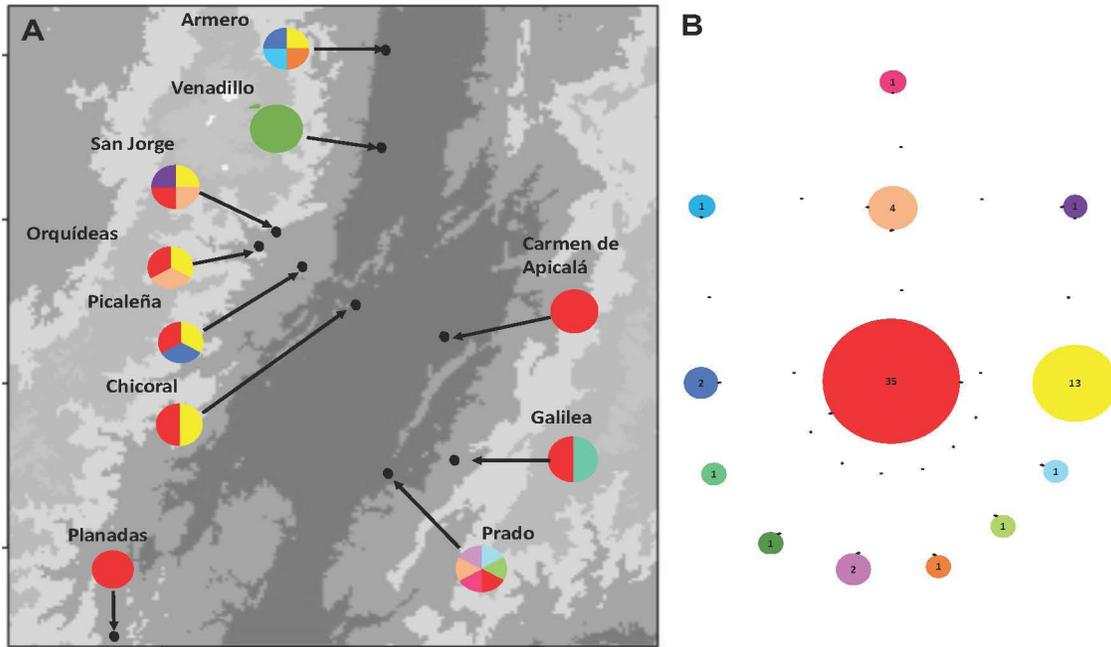
## Resultados

### Diversidad molecular y relaciones filogenéticas

El alineamiento final incluye 191 secuencias de 628pb, de las cuales 89 fueron nuevas (Tabla S4). De las 89 secuencias, 65 fueron de *B. xerophyllus* con un total de 14 haplotipos, nueve de los cuales fueron privados (población de Prado=3 y mayor número de haplotipos; Tabla 5). Chaparral y Venadillo presentaron un haplotipo único y privado, mientras que el haplotipo más abundante (35 individuos) estuvo compartido entre ocho poblaciones, en ambas Cordilleras (Central y Oriental) y en los tres rangos de altitud (color rojo, Fig. 9A). El siguiente haplotipo más abundante se encontró en trece individuos de cinco poblaciones, todas ellas pertenecientes a la Cordillera Central (Fig. 9A, color amarillo). Las poblaciones de Prado, San Jorge y Armero fueron las poblaciones con más haplotipos (6, 4 y 4, respectivamente). Los valores de diversidad nucleotídica fueron bajos ( $\pi = 0.0008-0.0035$ , promedio=0.0015) (Tabla 5). La red de haplotipos mostró un patrón en forma de estrella, donde los haplotipos en mayor frecuencia son centrales (Fig. 9B), con varios haplotipos derivados, en su mayoría separados por un paso mutacional, lo que sugiere expansión poblacional.

**Tabla 5.** Valores de diversidad basados en secuencias del gen COI (628pb) para 65 individuos de *B. xerophyllus*.  $N$  = número de muestras,  $S$  = sitios polimórficos,  $H$  = número de haplotipos,  $\pi$  = diversidad nucleotídica,  $\theta_w$  = tasa de mutación. Las poblaciones de Venadillo, Carmen de Apicalá, Planadas y Chaparral presentaron un único haplotipo.

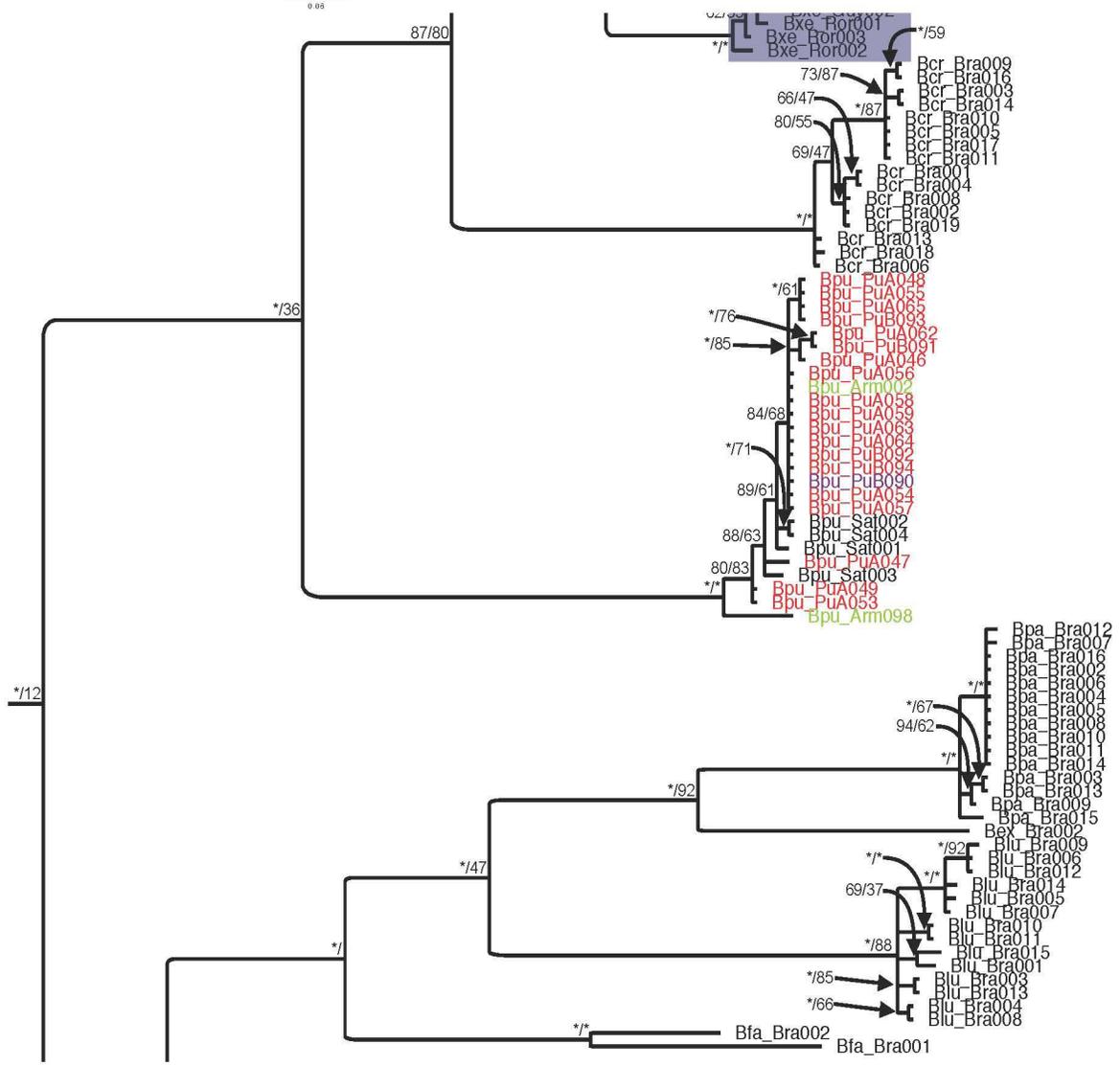
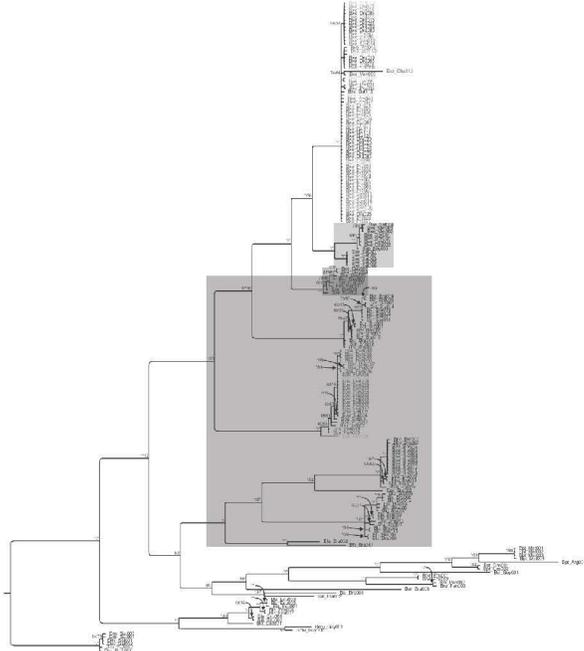
Población	$N$	$S$	$H$	$\pi$	$\theta_w$
San Jorge	11	2	4	0.0012	0.0011
Galilea	4	1	2	0.0008	0.0009
Armero	4	4	4	0.0035	0.0035
Chicoral	5	1	2	0.0010	0.0008
Orquídeas	14	2	3	0.0012	0.0010
Picaleña	4	2	3	0.0019	0.0017
Prado	19	5	6	0.0011	0.0023



**Figura 9.** Distribución geográfica y red de haplotipos para 11 poblaciones de *B. xerophyllus*. A) Distribución espacial de 14 haplotipos del gen COI (628pb). Las poblaciones de Carmen de Apicalá, Galilea y Prado se ubican en la vertiente occidental de la Cordillera Oriental; el resto se distribuyen en la vertiente oriental de la Cordillera Central. B) Configuración de la red mínima de haplotipos y número de individuos para cada haplotipo (tamaño del círculo es proporcional); las marcas transversales indican un paso mutacional.

Los resultados del análisis filogenético basados en inferencia Bayesiana (BI) y Máxima verosimilitud (ML) fueron similares, excepto para las relaciones entre *B. xerophyllus*, *B. crepitans* y *B. pugnax*. Específicamente, en el árbol de ML el clado de *B. pugnax* es recíprocamente hermano de *B. xerophyllus*, mientras que en el de BI, *B. crepitans* es especie hermana de *B. xerophyllus*, acorde a lo reportado por Orrico et al. (2017). Los valores de soporte del árbol bayesiano fueron en su mayoría altos (>95 pp), contrario a los valores de bootstrap en el análisis de ML, por lo que los resultados se describirán con base en el árbol Bayesiano. Se observan asimismo diferencias respecto a la filogenia de Orrico et al. (2017): *B. xerophyllus* de Colombia se diferencia de las poblaciones de Guyana (Fig. 10) y todas las poblaciones del Departamento del Tolima se separan como un clado distinto de *B. xerophyllus* del resto de Colombia. Los resultados de distancia genética confirman lo anterior, donde las poblaciones del Tolima presentan en general una distancia del 5% o mayor respecto a las de Santander, las cuales son las más cercanas geográficamente (Tabla S5), mientras que ésta fue >7% para la población de Chaparral (Tolima). Asimismo, la distancia genética entre las poblaciones del Valle del Magdalena en el Departamento del Tolima y las poblaciones de la localidad tipo (Guyana) fueron 6.8% y de 9% con respecto a la población de Chaparral. Por otro lado, todas las poblaciones de *B. pugnax* a lo largo de Colombia forman un clado (Fig. 10), acorde con los valores de distancia genética observados, donde las poblaciones de *B. xerophyllus* presentaron una distancia menor a 1% respecto a aquellas de *B. pugnax* en Armero y Purificación A y B (Tabla S5).







## Llamado de SNPs

Las 95 muestras de GBS produjeron 293,062,049 lecturas, con una longitud de 101pb. Se construyeron dos pseudogenomas de referencia con RADToolKit, y a partir de ellos identificar los SNPs. Los pseudogenomas estuvieron conformados por 91,257 y 79,939 loci para *B. xerophyllus* y *B. pugnax*, respectivamente. Los SNPs obtenidos fueron heterogéneos para ambas especies, donde en general *B. pugnax* presentó una mejor cobertura (6.3 a 25.6) respecto a *B. xerophyllus* (5 a 20) (Tabla 6), aunque se recuperaron en promedio menos SNPs para la primera (76,924 y 87,000 respectivamente). Con esta información se construyeron dos bases de datos, a 5X y 3X, para ambas especies (Tabla 7). Después de filtrar por calidad, se retuvieron 34,030 SNPs a 5X para 72 individuos de 10 poblaciones de *B. xerophyllus* y con 27,726 SNPs a 5X para 20 individuos de cuatro poblaciones de *B. pugnax*.

**Tabla 6.** Número de SNPs recuperados después de procesar los datos crudos con RADToolKit.

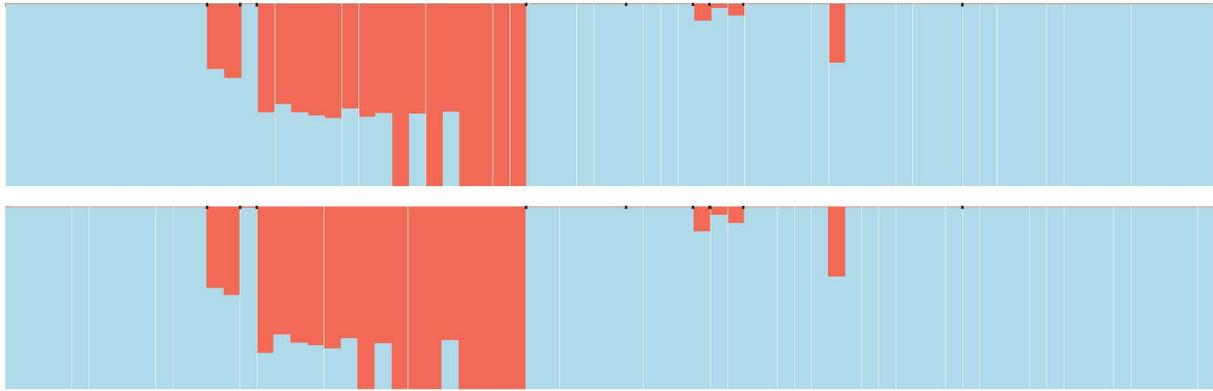
	<i>B. xerophyllus</i>		<i>B. pugnax</i>	
	Nº de loci	Coverage	Nº de loci	Coverage
Min	70,503	5.0	60,506	6.3
Max	89,246	20.0	79,066	25.6
Mean	87,000	13.9	76,924	18.4

**Tabla 7.** Número de SNPs obtenidos con RADToolKit ( $P$ -value <0.000001) con dos niveles de cobertura (3x y 5x).

	<i>B. xerophyllus</i>		<i>B. pugnax</i>	
	Nº de loci	Coverage	Nº de loci	Coverage
	41,329	3x	35,013	3x
	34,030	5x	27,726	5x

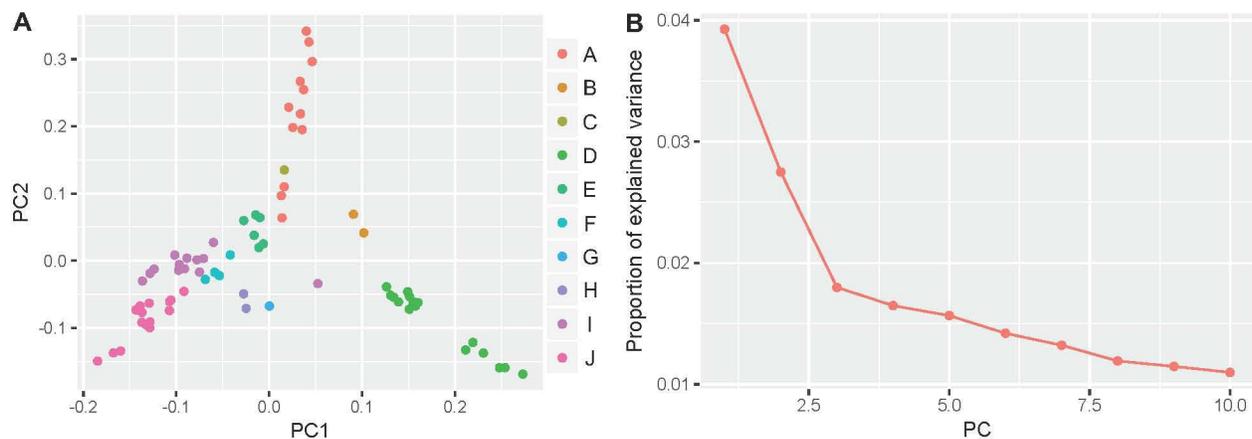
## Estructura genética poblacional

Los resultados de análisis de asignación con fastSTRUCTURE y BAPS para *B. xerophyllus* mostró dos grupos genéticos ( $K=2$ , Fig. 11), con proporciones de mezcla cercanas al 50% para algunos individuos. Por otro lado, ningún método recobró un patrón de estructura entre las cuatro poblaciones (Armero, Purificación A, Purificación B y Prado) de *B. pugnax*.

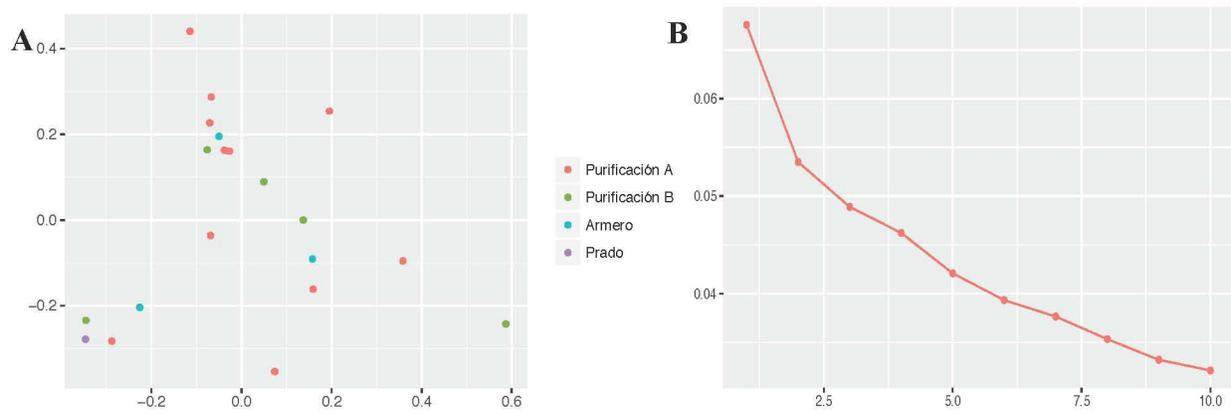


**Figura 11.** Asignación bayesiana de grupos genéticos para 72 individuos de *B. xerophyllus* con 34,030 SNPs (5X) con fastSTRUCTURE (parte superior) y BAPS (inferior) para  $K=2$ . Las líneas verticales negras separan cada población, desde rango bajo (A) hasta rango alto (J), de izquierda a derecha.

El PCA mostró un  $K=3$  para *B. xerophyllus* (Fig. 12) como el escenario más probable de agrupamiento genético basado en las recomendaciones de Luu et al. (2017), donde los dos primeros componentes separaron las poblaciones en grupos discretos. El primer componente separó las dos cordilleras y el segundo a las poblaciones de la Cordillera Central, a lo largo del gradiente altitudinal, desde las poblaciones de rango bajo a rango alto. Las poblaciones de rango alto también se agruparon a pesar de la distancia que las separa (aproximadamente 80 km en distancia lineal). En contraste, el PCA para *B. pugnax* no mostró estructura entre las poblaciones, sino un patrón mezclado entre los individuos de las cuatro poblaciones.

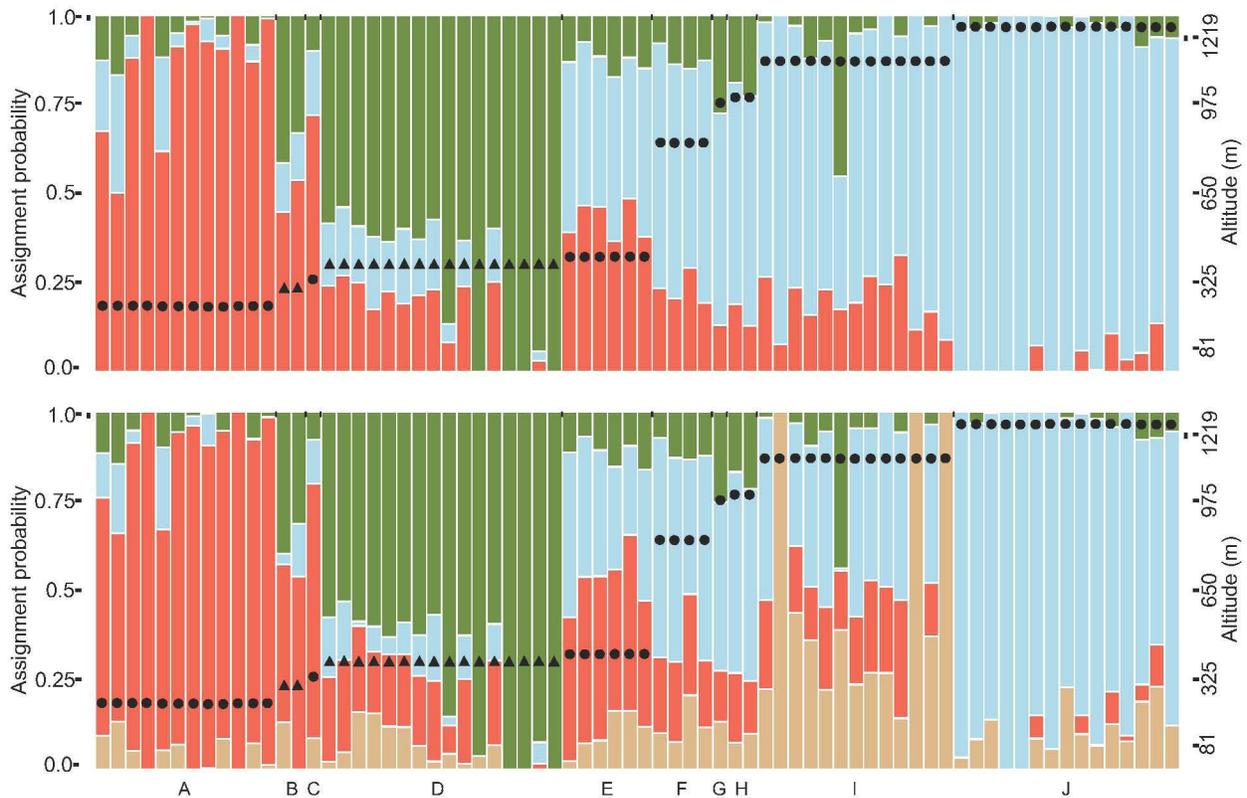


**Figura 12.** Análisis de componentes principales basado en 34,030 SNPs (5X) para 72 individuos de *B. xerophyllus*. A) Gráfica de puntos con la distribución de las poblaciones en los dos primeros componentes. B) Proporción de la varianza explicada por cada  $K$  (1-10), donde la flecha señala el número de grupos genéticos más probable encontrado por el PCA. Las poblaciones están organizadas de menor a mayor elevación (A-J, sucesivamente).

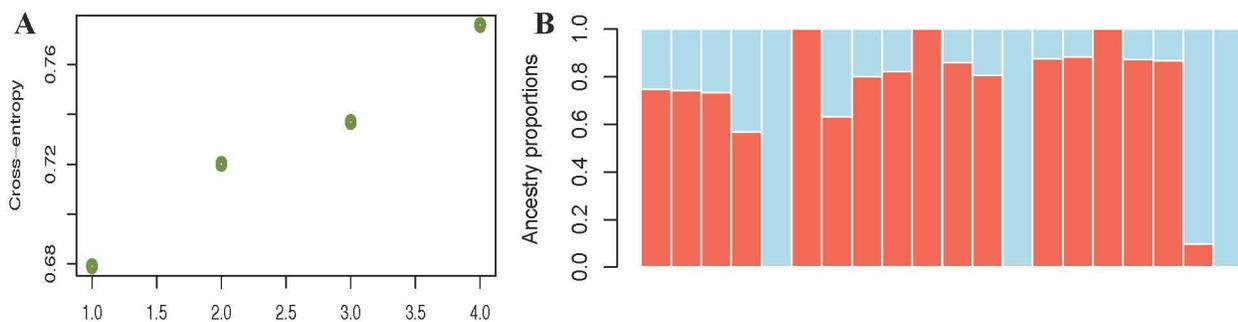


**Figura 13.** Análisis de componentes principales basado en 27,726 SNPs (5X) para 20 individuos de *B. pugnax*. A) Gráfica de puntos con la distribución de las poblaciones en los dos primeros componentes. B) La distribución de los puntos indica que no existe ningún patrón de estructura recobrado con pcadapt. B) Proporción de la varianza explicada por cada  $K$  (1-10).

Los resultados de asignación con sNMF de los datos corregidos ( $MAF < 5\%$ ), con un total de 21,045 y 21,231 SNPs para *B. xerophyllus* y *B. pugnax* respectivamente, mostraron para la primera que  $K=3$  tuvo la menor entropía cruzada (Fig. 14). El patrón general fue de mezcla dentro de los tres grupos genéticos, con un patrón clinal con menores proporciones de ancestría para el grupo genético de rango bajo y, a medida que los individuos se encuentran a mayor altitud, se asignan al grupo genético de rango alto. El siguiente valor de  $K$  con menor entropía fue de 4, que recobró tres individuos de San Jorge estructurados, lo que sugiere un modelo jerárquico al menos dentro de esa población (Fig. 14). *B. pugnax* no mostró estructura genética (Fig. 15).

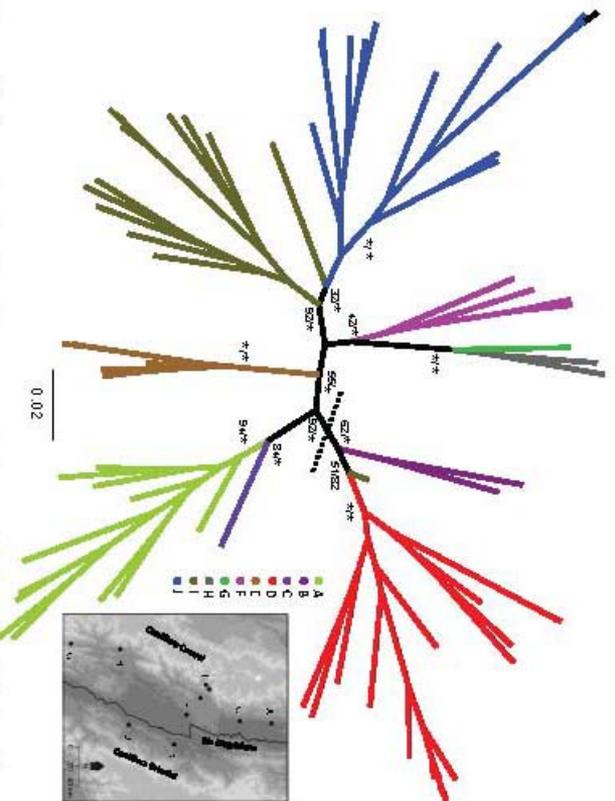


**Figura 14.** Estimación de coeficientes de ancestría con menor entropía con algoritmos rápidos de factorización de matriz dispersa no negativa (sNMF), basado en 21,045 SNPs (MAF<5%) para 72 individuos de *B. xerophyllus*. El valor mínimo de entropía cruzada obtenido  $K=3$  (arriba) y  $K=4$  (abajo). Las líneas verticales negras separan cada población, desde rango bajo (A) hasta rango alto (J), de izquierda a derecha. Los círculos indican las poblaciones de la vertiente oriental de la Cordillera Central y los triángulos las de la vertiente occidental de la Cordillera Oriental.



**Figura 15.** Estimación de coeficientes de ancestría con menor entropía con algoritmos rápidos de factorización de matriz dispersa no negativa (sNMF), basado en 21,231 SNPs (MAF<5%) para 20 individuos de *B. pugnax*. A) Valores de entropía cruzada para las cuatro poblaciones. B) Proporciones de asignación para un  $K = 2$ .

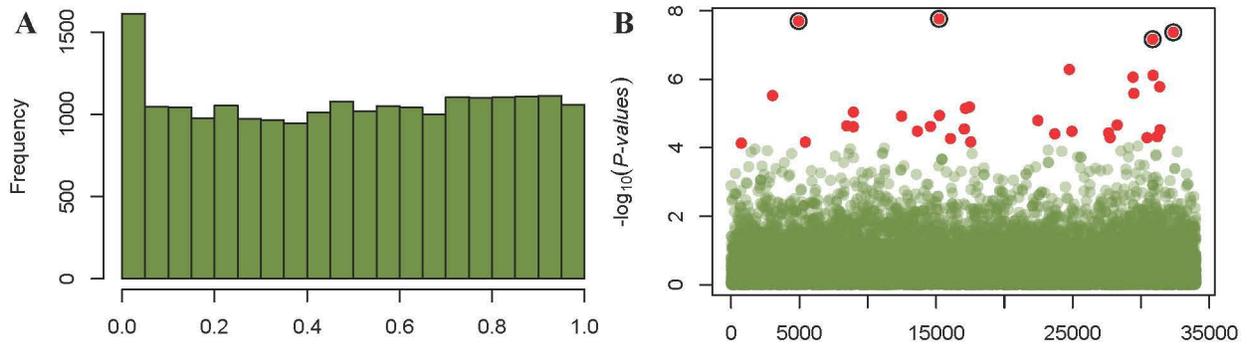
La reconstrucción filogenética basada en 34,030 SNPs mostró la misma topología con BI y ML (Fig. 16) la cual fue consistente con los resultados de asignación y estructura, mostrando relaciones cercanas entre las poblaciones que comparten rangos de altitud (Fig. 16). La topología muestra poblaciones separadas en relación con el río Magdalena.



**Figura 16.** Reconstrucción filogenética no enraizada con Máxima verosimilitud e Inferencia Bayesiana con base en 34,030 SNPs para 72 individuos de *B. xerophilus*. Se muestran los valores de soporte (bootstrap/probabilidad posterior: \*95) de los nodos. Las poblaciones están organizadas de menor a mayor altitud (A-J, sucesivamente). La línea punteada indica si no Magdalena como barrera geográfica, las poblaciones a la izquierda de la línea son de la Cordillera Central y las poblaciones a la derecha de la Cordillera Oriental.

**Loci candidatos a selección, asociación genómica climática y fenotípica, y aislamiento por ambiente**

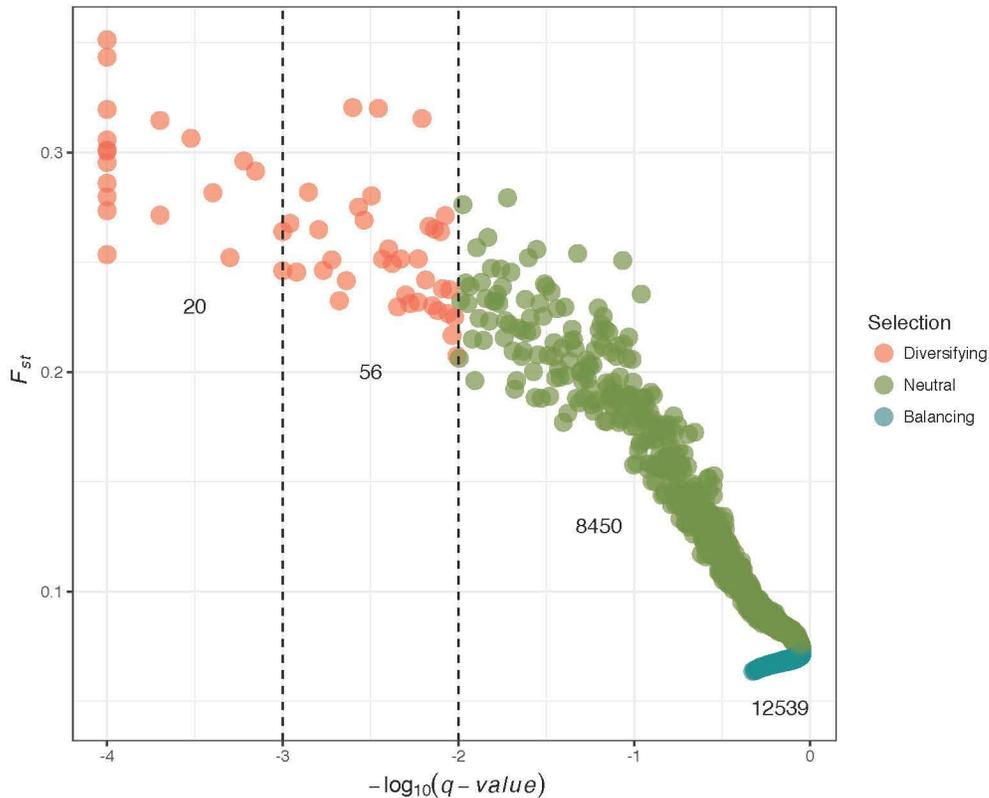
Los resultados del análisis con pcardapt para *B. xerophilus* recobraron 4 y 10 SNPs outlier candidatos a selección bajo umbrales de <0.001, <0.01 respectivamente (Fig. 17, Tabla 8A). Por otro lado, BayeScan fue menos conservador, con 20 y 56 SNPs para los mismos umbrales (Fig. 18). Este método también encontró 12,539 bajo selección estabilizadora aunque no con el suficiente valor estadístico. No se recobraron SNP outlier para *B. pugnas* (Tabla 8B).



**Figura 17.** Gráficas de los SNPs outlier obtenidos con pcadapt, a partir de 34,030 SNPs para 72 individuos de *B. xerophyllus*. A) Histograma (*P*-values) que muestra el número de SNPs neutros y outliers (cerca de 1). B) Gráfica de Manhattan con la disposición de los *P*-values; en rojo los 33 SNPs outlier (alfa <0.05), donde se resaltan los 4 SNPs con un alfa <0.001.

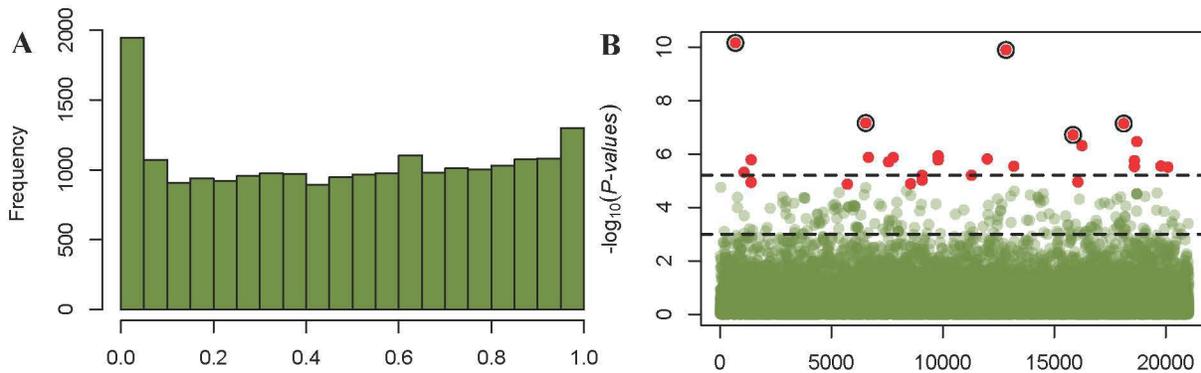
**Tabla 8.** Prueba de significancia estimada con pcadapt de loci candidatos a selección de A) *B. xerophyllus*, basado en 34,030 SNPs de 72 individuos y B) de *B. pugnax* basado en 27,726 SNPs de 20 individuos.

	Umbral o valor de alfa						
	<0.0001	<0.001	<0.01	<0.025	<0.05	<0.1	<1
<b>A</b>							
<i>P</i> -value	35	129	528	988	1610	2655	21389
<i>q</i> -value	0	4	10	16	33	64	21389
Local FDR	0	3	7	10	16	33	2207
<b>B</b>							
<i>P</i> -value	7	39	753	1250	1945	3301	21370
<i>q</i> -value	0	0	0	0	0	1	21370
Local FDR	0	0	0	0	0	1	3821

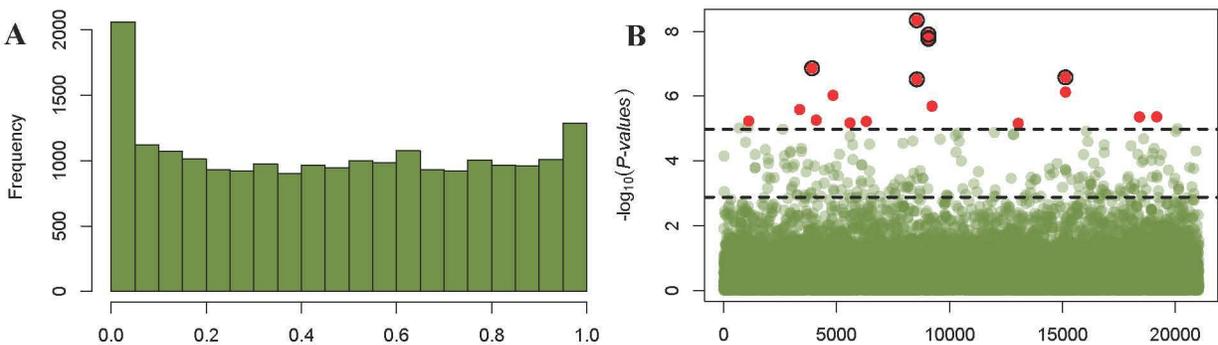


**Figura 18.** Identificación de loci bajo selección estimados con BayeScan, con base en 21,045 SNPs (MAF<5%) para 72 individuos de *B. xerophyllus*. Se muestran en rojo los loci outlier bajo valores de alfa <0.001 y <0.01 (línea punteada a la izquierda y al centro, respectivamente). Los números indican los SNPs detectados bajo los diferentes tipos de selección (diversificadora, neutral y balanceadora). Los SNPs encontrados bajo selección balanceadora no fueron significativos.

Los resultados de asociación genómica (EAA) con LFMM indicaron 5 y 30 SNPs asociados (alfa <0.001 y <0.01) a la variación climática para *B. xerophyllus* (Fig. 19, Tabla 9A); esta fue dada por el primer componente con un 93.5% de la varianza climática y fue explicado por la combinación de las once variables de temperatura de BioClim (bio1 -0.310, bio2 -0.293, bio3 0.292, bio4 -0.244, bio5 -0.311, bio6 -0.310, bio7 -0.308, bio8 -0.310, bio9 -0.311, bio10 -0.311, bio11 -0.310), en donde solo la bio3 (Isotermalidad,, que es el índice dado por el rango diario promedio con respecto al rango anual [BIO3 = (BIO2/BIO7)(\*100)]) fue la única positivamente asociada a los outliers. En cuanto a la asociación genómica-fenotípica, se encontraron 7 y 18 SNPs candidatos asociados a la longitud total de cuerpo o longitud rostro-cloaca (SVL)(Fig. 20, Tabla 9B). Además, cuatro SNPs recuperados fueron compartidos por los análisis de asociación climático y fenotípico. En cuanto a *B. pugnax*, el EAA mostró 10 loci candidatos a selección bajo un alfa <0.05 (Tabla 10A). Aunque este umbral no se consideró significativo en ningún análisis. Las asociaciones no fueron espurias o sesgadas, debido a que no se recuperaron SNPs cuando la covariable (ambiental y fenotípica) se calibró a un único valor para todos los individuos (Tabla 10B).



**Figura 19.** Análisis de asociación genómico climática (EAA) estimado con LFMM, con base en 21,045 SNPs para 72 individuos de *B. xerophyllus*. A) Histograma ( $P$ -values) que muestra el número de SNPs neutros y outliers (cerca de 1). B) Gráfica de Manhattan con la disposición de los  $P$ -values; en rojo los 30 SNPs outlier (alfa  $<0.01$ ), donde se resaltan los 5 SNPs con un alfa  $<0.001$ .



**Figura 20.** Análisis de asociación genómico fenotípica (EAA) estimado con LFMM, con base en 21,045 SNPs para 72 individuos de *B. xerophyllus*. A) Histograma ( $P$ -values) que muestra el número de SNPs neutros y outliers (cerca de 1). B) Gráfica de Manhattan con la disposición de los  $P$ -values; en rojo los 30 SNPs outlier (alfa  $<0.05$ ), donde se resaltan los 5 SNPs con un alfa  $<0.001$ .

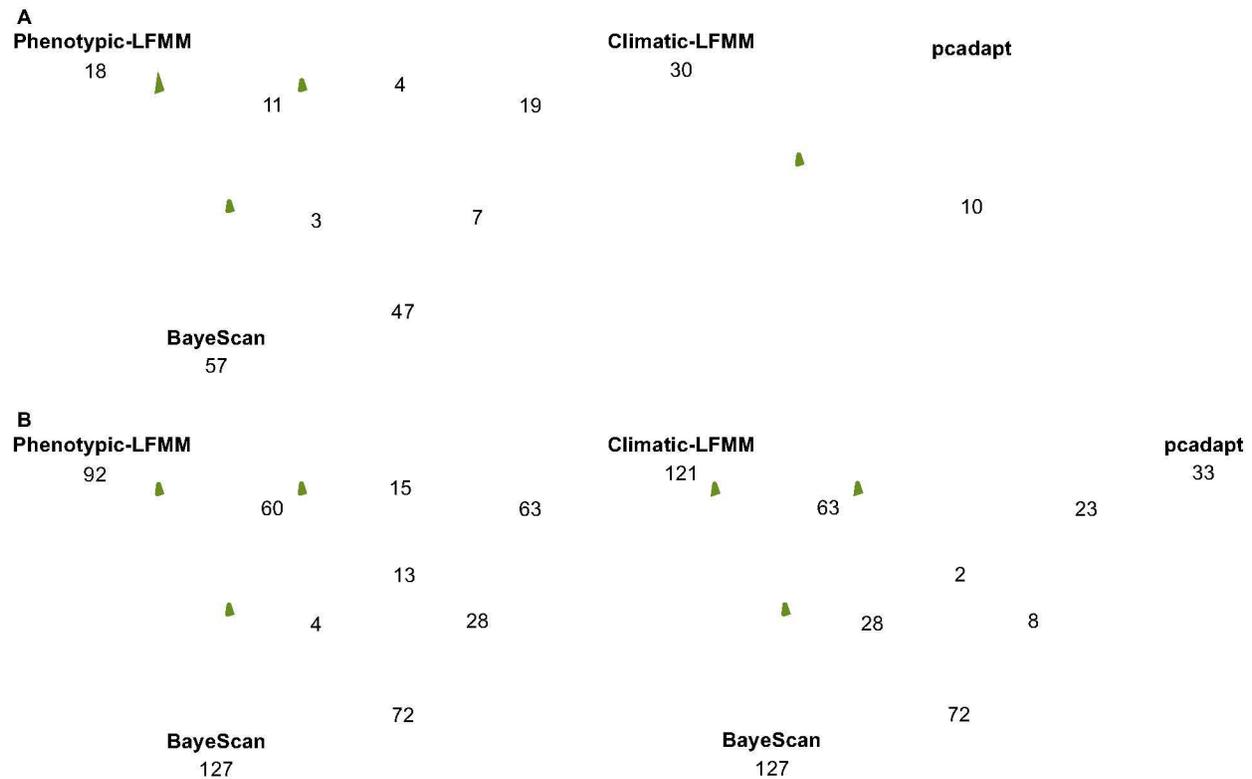
**Tabla 9.** Prueba de significancia del análisis de A) asociación genómico climática (EAA) y B) de asociación genómico fenotípica (EAA), de *B. xerophyllus*, estimadas con LFMM y con base en 21,045 SNPs (MAF $<5\%$ ) de 72 individuos.

	Umbral o valor de alfa						
	$<0.0001$	$<0.001$	$<0.01$	$<0.025$	$<0.05$	$<0.1$	$<1$
<b>A</b>							
$P$ -value	85	211	740	1280	1945	3017	21045
$q$ -value	2	5	30	87	121	212	21045
Local FDR	0	2	20	32	75	114	2569
<b>B</b>							
$P$ -value	63	181	680	1132	1769	2864	21045
$q$ -value	4	7	18	56	92	164	21045
Local FDR	0	4	9	30	48	83	2647

**Tabla 10.** Prueba de significancia estimada con LFMM para el análisis de A) asociación genómico climática (EAA) de *B. pugnax* en 21,231 SNPs (MAF<5%) de 20 individuos y B) de asociación genómico climática (EAA), de *B. xerophyllus*, con 21,045 SNPs (MAF<5%) y un mismo valor de correlación (0.1) en 72 individuos.

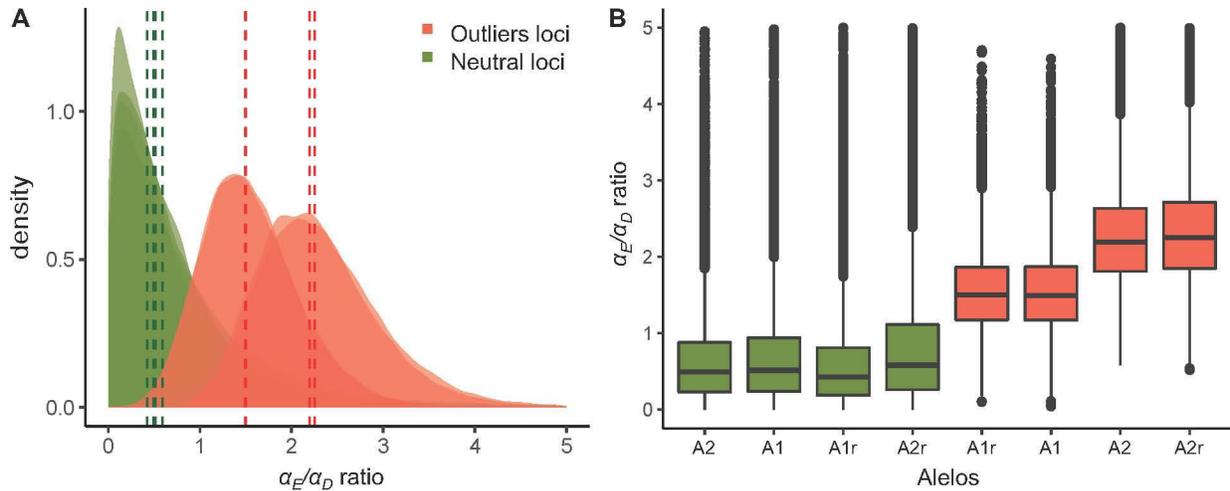
	Umbral o valor de alfa						
	<0.0001	<0.001	<0.01	<0.025	<0.05	<0.1	<1
<b>A</b>							
<i>P</i> -value	16	75	322	677	1056	1912	21231
<i>q</i> -value	0	0	0	6	10	10	21231
Local FDR	0	0	0	3	6	8	659
<b>B</b>							
<i>P</i> -value	0	0	0	0	0	0	21045
<i>q</i> -value	0	0	0	0	0	0	21045
Local FDR	0	0	0	0	0	0	21029

Comparando los métodos para obtener mayor certeza de los SNPs detectados como candidatos a selección, se observó que todos recobraron SNPs para *B. xerophyllus* bajo diferentes umbrales (Fig. 18-20). Se encontraron 13 SNPs compartidos bajo un umbral de <0.05, entre el LFMM climático, LFMM fenotípico y BayeScan. Sin embargo, solo dos entre BayeScan, LFMM climático y pcadapt (Fig. 21B). No obstante, en una búsqueda más astringente (<0.01), pcadapt no compartió ningún SNP con los otros métodos y tampoco se encontraron SNPs compartidos entre LFMM climático, LFMM fenotípico y BayeScan (Fig. 21B).



**Figura 21.** SNPs outlier candidatos a selección compartidos entre los tres diferentes métodos para 72 individuos de *B. xerophyllus*. Los valores de alfa para  $q$ -value (LFMM y pcadapt) y FDR (BayeScan), se determinaron a  $<0.01$  (A) y  $<0.05$  (B). Métodos de detección de loci candidatos a selección BayeScan y pcadapt, y de asociación ambiental LFMM. El número total de loci outliers se indica bajo el nombre de cada método.

Por otro lado, el análisis con BEDASSLE alcanzó la estacionalidad de las MCMC con 10 millones de generaciones (Fig. S3 y S4), lo que muestra una buena calibración del modelo. Después de eliminar el 50% de las cadenas como burnin, el dataset de 95 loci candidatos (la totalidad de SNPs obtenidos con pcadapt, BayeScan, LFMM-climático y LFMM-fenotípico al umbral  $<0.01$ ) mostró que los promedios de ambos alelos ( $r=1.55, 1.55, 2.27$  y  $2.33$ ; alelo uno y réplica, alelo dos y réplica, y así sucesivamente) (Tabla 11) presentaron una mayor contribución del ambiente a diferencia del dataset neutral ( $r=0.67, 0.72, 0.65, 0.92$ ; alelo uno y réplica, alelo dos y réplica, y así sucesivamente) (Tabla 11), lo que se correlacionó con aislamiento por distancia (Fig. 22). A diferencia de otras pruebas como el mantel parcial, BEDASSLE permite determinar la fuerza del factor climático respecto al aislamiento geográfico (Bradburd et al. 2013), que para el caso de *B. xerophyllus* mostró que ambos alelos están siendo fuertemente asociados a aislamiento por ambiente, aunque mucho más para el alelo 2. Estos resultados fueron apoyados a través del índice de fijación ( $F_{st}$ ) que mostró valores cercanos a 1 en los loci outlier de las poblaciones que presentaron mayor diferenciación en la temperatura, y mayor valor de  $F_{st}$  para las poblaciones más lejanas en los loci neutrales (Tabla S6 y S7 en anexos).



**Figura 22.** Distribuciones marginales de la tasa para determinar la contribución ambiental y geográfica a la diferenciación genética con BEDASSLE, para 95 loci neutrales y outliers en *B. xerophyllus*. A) Las líneas punteadas indican los valores de la mediana. De izquierda a derecha líneas verde: 0.43, 0.50, 0.52 y 0.59 (alelo 2, alelo 1, réplica alelo 1, réplica alelo 2, respectivamente), líneas rojas: 1.49, 1.50, 2.20 y 2.25 (réplica alelo 1, alelo 1, alelo 2 y réplica alelo 2, respectivamente). B) Diferencias entre las distribuciones marginales de las MCMC para la tasa  $\alpha_E/\alpha_D$  ( $\alpha_E$ : asilamiento por ecología-ambiente,  $\alpha_D$ : asilamiento por distancia). Las figuras A y B fueron reescaladas debido a valores extremos (129, 27 y 19 para la réplica del alelo 2, réplica del alelo 1 y alelo 1, respectivamente) en los loci neutrales (ver Fig. S5 del anexo para la gráfica original). Los valores ambientales ( $^{\circ}\text{C}$ ) y geográficos (Km) fueron transformados a logaritmo natural para el análisis.

**Tabla 11.** Valor promedio e intervalos de confianza de la contribución relativa de la distancia ambiental ( $\alpha_E$ ) y la distancia geográfica ( $\alpha_D$ ) con BEDASSLE, para 95 loci outliers y 95 neutrales de *B. xerophyllus*.

Parámetro	Loci outliers				Loci neutrales			
	Alelo 1	Alelo 1 rep	Alelo 2	Alelo 2 rep	Alelo 1	Alelo 1 rep	Alelo 2	Alelo 2 rep
Mean ratio ( $\alpha_E/\alpha_D$ )	1.55	1.55	2.27	2.33	0.67	0.72	0.65	0.92
CI (95%)	0.77-2.52	0.77-2.52	1.36-3.42	1.36-3.57	0.04-1.84	0.05-2.03	0.03-1.76	0.05-2.71

## Discusión

Este estudio presenta evidencia de señales de selección (climática y fenotípica) y aislamiento por ambiente en anfibios neotropicales, basado en secuenciación de nueva generación (NGS) y loci nucleares de SNPs. Los resultados indican que *B. xerophyllus* en el Departamento del Tolima (Colombia) presenta estructuración genética asociada a barreras geográficas en presencia de flujo génico, así como un patrón clinal de estructura correlacionado con un gradiente ambiental. Asimismo, *B. xerophyllus* en el Tolima es un grupo monofilético bien soportado, divergente de las poblaciones originales de Guyana, lo que sugiere que dicha población puede considerarse como una especie diferente.

Aunque el objetivo de este trabajo no era una revisión detallada de la filogenia de estas ranas, los resultados muestran que las poblaciones de *B. xerophyllus* en el Tolima son un clado o linaje recíproco respecto a las poblaciones del norte y oriente de Colombia, ambos separados de las poblaciones tipo en Guyana. Lo anterior es congruente con la distancia genética entre grupos, >5% y cercanas a 7%, respecto a otras poblaciones de Colombia y Guyana respectivamente. Con ello se evidencia la necesidad de una revisión filogenética y filogeográfica de *B. xerophyllus*, para determinar si ésta es un complejo de especies crípticas y no una especie de amplia distribución.

Al interior del Tolima, la reconstrucción filogenética mitocondrial y las distancias genéticas mostraron poca diferenciación filogenética para *B. xerophyllus*, donde todas las poblaciones se agrupan en un único clado. Incluso, poblaciones separadas por más de 140 km (Armero y Planadas) en distancia lineal, presentaron una distancia genética (K2P) de 0.0014. Es de llamar la atención que ni el río Magdalena ni la separación entre las Cordilleras Central y Oriental, o el gradiente de altitud, se recuperan como barreras históricas. Acorde con lo anterior, la red de haplotipos mostró que el haplotipo más abundante se distribuye en ambas Cordilleras y en todos los rangos de altitud. La configuración en estrella de la red sugiere flujo génico y quizás expansión poblacional a lo largo del Valle del Magdalena, lo que apoyaría la falta de diferenciación histórica. Incluso, las relaciones filogenéticas de *B. pugnax* fueron similares, mostrando un clado fuertemente soportado, sin estructura al interior de las poblaciones en Colombia, a pesar de la distancia lineal mayor a 300 km entre poblaciones.

Los análisis basados en loci nucleares (SNPs) para *B. xerophyllus* mostraron resultados complementarios, que muestran patrones más recientes comparados con la información del gen mitocondrial COI. Con los análisis de asignación (BAPS y fastSTRUCTURE) se identificaron dos grupos genéticos ( $K=2$ ) relativamente estructurados, que muestran proporciones de mezcla cercanas al 50% para las poblaciones de la Cordillera Oriental. Con los dos grupos genéticos, así como con otras líneas de evidencia (PCA y sNMF), se detectó el río Magdalena como una barrera geográfica al flujo genético en *B. xerophyllus*, con la división entre ambas cordilleras (Central y Oriental), aunque no lo restringe completamente. Así, cabe preguntarse ¿cómo es que individuos de la Cordillera Central presentan alelos mezclados de la Cordillera Oriental, incluso en poblaciones muy distantes tanto geográfica como altitudinalmente?

Lo anterior contrasta con la evidencia de otros estudios, e incluso con lo encontrado para *B. pugnax* que no mostró estructura genética, aún entre poblaciones a más de 300 km de distancia. En general,

varios estudios han tratado de probar si el río Magdalena es una barrera al flujo génico. Por ejemplo, Link et al. (2015) evaluaron monos araña (*Ateles hybridus*) reconociendo que las poblaciones de ambos márgenes del río presentaban divergencia fenotípica; no obstante, no encontraron ningún efecto de barrera. Esa misma conclusión obtuvieron Brochero et al. (2010) y Sandoval-H et al. (2017), quienes probaron aves y mosquitos *Anopheles* respectivamente. Otros estudios, han explorado la barrera climática promovida por el Valle seco del Magdalena, encontrando patrones de especiación en aves, pero no estructura genética poblacional (Cadena et al. 2007, Gutiérrez-Pinto et al. 2012, Valderrama et al. 2014). En anfibios, Muñoz-Ortiz et al. (2015) sugieren estructura asociada al Valle del Magdalena con ranas del género *Rheobates*; sin embargo, ellos también encuentran patrones que promueven la especiación y no estructura genética poblacional. Todos estos trabajos coinciden en haber utilizado tanto marcadores mitocondriales (Gutiérrez-Pinto et al. 2012; Valderrama et al. 2014; Muñoz-Ortiz et al. 2015; Sandoval-H et al. 2017) y nucleares (Cadena et al. 2007), e incluso marcadores finos como microsatélites (Brochero et al. 2010), sin recobrar estructura genética poblacional asociada al río o al Valle.

La cierta estructura genética que se recupera con SNPs asociada al río Magdalena en *B. xerophyllus* apoya así un efecto de barrera especie-específica en presencia de flujo génico. Aún más, se observó también un patrón clinal en *B. xerophyllus*, lo que sugiere también un efecto de barrera climática asociado con condiciones diferentes a lo largo del rango altitudinal, entre poblaciones que habitan un rango aproximado de 1,000 m sobre la Cordillera Central. La evidencia de restricción parcial al flujo con SNPs pero no con secuencias mitocondriales muestra la importancia de contrastar diferentes marcadores para comprender como actúan las barreras al flujo génico a diferentes escalas temporales y espaciales. Más aún, si se tiene en cuenta la evidencia de varios clados a lo largo de la distribución de esta especie. Por lo tanto, determinar si este patrón clinal de estructura génica corresponde con otros clados bajo condiciones geográficas similares, apoyaría la hipótesis de un efecto adaptativo por ambiente.

Aunque no existe evidencia de la capacidad de dispersión de *B. xerophyllus*, el hecho de que se haya determinado que existe flujo génico entre las poblaciones a lo largo del Departamento del Tolima sugiere que esta especie tiene alta vagilidad. Alternativamente, el flujo de genes podría estar favorecida por procesos de cambio de uso del suelo a lo largo del Valle del Magdalena. En el Departamento del Tolima la meseta ha sido considerablemente transformada, donde persisten solo unas pocas áreas de bosque seco y bosque de galería (Pizano & García 2014). Este cambio ha incorporado grandes extensiones de cultivo de arroz y distritos de riego por la demanda de agua para la irrigación, lo que ha podido promover nuevos hábitats disponibles para estas ranas, ayudando a mantener el movimiento de individuos y flujo genético entre las poblaciones. Además, esta especie se restringe a cuerpos de agua lénticos, no es afectada por perturbaciones antrópicas, es frecuente en zonas de cultivo cerca de viviendas rurales, y no está asociada al interior de bosques (Orrico et al. 2017 y observaciones personales), lo que sugiere que cierto flujo puede estar mediado por la transformación antrópica. Las áreas de cultivo fragmentan o cambian la configuración espacial del hábitat (Wilson et al. 2016), lo que puede generar nuevas presiones de selección, por ejemplo, por presencia de agroquímicos. Sin embargo, Velásquez et al. (2016) recientemente probaron que tanto embriones y renacuajos de *B. xerophyllus* podrían sobrevivir a los efectos de los agroquímicos utilizados en el cultivo de arroz. En conjunto, la evidencia sugiere que el flujo podría ser favorecido

en las poblaciones *B. xerophyllus* a través del cambio de la configuración espacial natural a una agrícola dentro del Valle del Magdalena.

Los análisis de aislamiento por ambiente (IBE), los métodos de detección de outliers y los de asociación ambiental (EAA), se utilizan actualmente para explorar escenarios de adaptación a una escala genómica. Así, estos métodos han revolucionado la forma de abordar los procesos adaptativos, desde plantas (De Kort et al. 2014; Abebe et al. 2015; Aguirre-Liguori et al. 2017), aves (Termignoni-García et al. 2017), peces (Nielsen et al. 2009; Marques et al. 2016; Marques et al. 2017) y lagartos (Rodríguez et al. 2017), por mencionar algunos. Para el caso de *B. xerophyllus*, padapt (10 loci outliers) y LFMM (18 y 30) fueron mucho más conservadores que BayeScan (56) al detectar loci candidatos a selección. Este resultado concuerda con lo reportado por Rellstab et al. (2015), quienes señalan que BayeScan presenta una tasa de detección de falsos positivos mayor respecto a otros métodos. Por otro lado, no se detectaron loci estadísticamente significativos bajo selección balanceadora, probablemente resultado de que las poblaciones de *B. xerophyllus* no presentan una fuerte estructuración, lo cual se ha sugerido como razón para no detectar loci bajo dicha selección (Foll & Gaggiotti 2008). Justamente, se utilizó LFMM porque este programa ha mostrado un buen desempeño en presencia de flujo genético (Rellstab et al. 2015; Forester et al. 2016), bajo diferentes escenarios simulados de variación genética (De Villemereuil et al. 2014) y en estudios empíricos con fauna (Mazzarella et al. 2016, Rodríguez et al. 2017, Termignoni-García et al. 2017). Además, este método no solo detecta loci candidatos a selección sino que utiliza un enfoque basado en análisis de asociación ambiental (EAA) para explorar la variación genética asociada a factores particulares del ambiente (Rellstab et al. 2015). Los resultados de asociación climática y fenotípica con LFMM mostraron 5 y 7 SNPs ( $q$ -value  $<0.001$ ) candidatos a selección; dado que este método corrige por efectos demográficos proporciona una alta credibilidad de los SNPs candidatos (Frichot et al. 2013; Rellstab et al. 2015), lo que proporciona certeza del papel que juegan en procesos de adaptación local de *B. xerophyllus*.

Los resultados de diferenciación genética asociada con características geográficas y ambientales del paisaje (BEDASSLE) evidencia la importancia de utilizar marcadores neutrales y bajo selección para entender la evolución de las poblaciones a lo largo de paisajes heterogéneos. Es decir, en este trabajo se detectó que los loci outliers presentan un patrón de aislamiento por ambiente, mientras que, los loci neutrales muestran un patrón de aislamiento por distancia. Ello demuestra que diferentes patrones evolutivos actúan de forma heterogénea a lo largo del genoma en *B. xerophyllus*.

Los patrones clinales de estructura genética en presencia de flujo genético se explican por cambios paulatinos en las frecuencias alélicas que tienen efectos pequeños, a diferencia de patrones alopátricos donde la selección disruptiva favorece picos adaptativos con poca adecuación en valores intermedios (Saltz et al. 2017). Dichos patrones pueden ser difíciles de interpretar bajo un modelo de adaptación local, pues si el flujo genético homogeniza las frecuencias alélicas entre poblaciones (Hamilton 2009; Hedrick 2010), se esperaría poca diferenciación fenotípica en una clina. Por lo tanto, la selección debería ser lo suficientemente fuerte para que se dé la diversificación fenotípica por adaptación (Slatkin 1978; Savolainen et al. 2013). De tal forma que para el caso de *B. xerophyllus*, que presenta tanto mezcla genética (flujo) como diversificación fenotípica significativa y loci candidatos a selección climática y fenotípica, pueden ser producto de pequeños cambios genéticos con fuerte impacto en adaptación, generando así diferenciación fenotípica (Orr 2005; Savolainen et

al. 2013; Marques et al. 2016). Debido a que no existe un genoma cercano que permita determinar la identidad de los SNPs outliers, pruebas de desempeño podrían ayudar a esclarecer el papel de la diversificación en el tamaño corporal. Además, teniendo en cuenta que los resultados obtenidos corresponden a un clado divergente, la misma respuesta fenotípica en otros clados de *B. xerophyllus* apoyaría la hipótesis de adaptación local. No obstante, otros factores no evaluados como la plasticidad fenotípica, también podrían llevar a divergencia fenotípica.

Aunque en este trabajo no se midió directamente la fuerza de la selección en *B. xerophyllus*, sino que se exploró un escenario correlativo de adaptación climática y fenotípica, los resultados obtenidos se pueden explicar considerando que: *i*) la selección esté operando sobre otros factores fuertemente correlacionados no evaluados; *ii*) existan efectos de sesgo estadístico por un bajo número de muestras; y *iii*) el sesgo inherente de los métodos. No obstante, en el primer caso, muchos factores pueden covariar a lo largo de clinas altitudinales, por lo que abordarlos todos en un estudio empírico con especies no modelo y poca información biológica es poco factible. Segundo, en el diseño de muestreo se propuso obtener pocas muestras por población, a costa de maximizar la varianza espacio-ambiental, como ha sido sugerido para el estudio de señales de selección a escala del paisaje (Hall & Beissinger 2014; Wang & Bradburd 2014; Richardson et al. 2016). Finalmente, no se encontraron loci candidatos a selección para *B. pugnax* ni para *B. xerophyllus* cuando se hizo el análisis con un único valor de temperatura y de tamaño corporal, lo que apoya que con los análisis de asociación climática y fenotípica, del genoma no se está detectando una correlación espuria.

En resumen, en este trabajo se presenta evidencia sobre adaptación climática y fenotípica a lo largo de un gradiente altitudinal, en presencia de cierto flujo genético, en las poblaciones de *B. xerophyllus*. Asimismo, se muestra la presencia de estructura genética asociada con barreras geográficas como el río Magdalena y aislamiento por ambiente. Se describen también procesos evolutivos que parecen sólo actuar en las poblaciones de *B. xerophyllus* y no en *B. pugnax*, lo que sugiere que éstos son especie-específicos. Aunque, se encontraron un número importante de loci candidatos a adaptación local, estos pueden estar presentes en genes bajo selección positiva o cercanos a estos. No obstante, a pesar de que los resultados son solo exploratorios, estos loci son de interés para futuros trabajos que profundicen sobre la identidad y el papel de estos en adaptación climática y diversificación fenotípica.

## Conclusiones

Este trabajo muestra que utilizando marcadores genómicos (SNPs) obtenidos con genotipado por secuenciación (GBS) asociado a sitios restricción fue posible desarrollar un protocolo para determinar adaptación climática y fenotípica en la rana objeto de estudio. De igual forma, apoya el uso de marcadores mitocondriales (secuencias del gen COI) y nucleares (SNPs), para evaluar patrones espacio-temporales diferentes, históricos (diversificación) y contemporáneos (diferenciación genética a nivel poblacional) para entender procesos evolutivos.

La evidencia filogenética mitocondrial sugiere que las poblaciones de *Boana xerophyllus* a lo largo del Valle del Magdalena en el Departamento del Tolima (Colombia) son un linaje diferente en relación con aquellas que se distribuyen en Guyana. Ello implica que *B. xerophyllus* no es una única especie con amplia distribución, y que se requiere una evaluación taxonómica detallada para determinar las diferentes especies. Es notable que, al interior de las poblaciones de *B. xerophyllus* en el Departamento del Tolima, no se detectaron patrones de estructuración genética histórica; lo mismo se encontró para *B. pugnax*, aunque en este caso el número de individuos analizados fue limitado.

El patrón clinal mostró una asociación entre temperaturas más bajas y SNPs candidatos a selección a medida que las poblaciones se presentan a una mayor altitud; además, se correlacionó con SNPs outlier para el tamaño corporal, a pesar de la presencia de flujo génico. Se sugiere que unos pocos SNPs podrían estar sujetos en adaptación climática y en diversificación morfológica gracias a la clina altitudinal.

Las poblaciones de *B. xerophyllus* mostraron un patrón de aislamiento por ambiente para loci candidatos a selección y aislamiento por distancia para loci neutrales. Lo anterior demuestra que el uso de marcadores genómicos como SNPs permite explorar historias evolutivas genómicas heterogéneas.

La evidencia conjunta de este estudio permite plantear la hipótesis de que las poblaciones de *B. xerophyllus* en el Departamento del Tolima están bajo un proceso de diversificación fenotípica y adaptación local en presencia de flujo genético.

## **Conclusiones generales**

Este es el primer trabajo que analiza sistemáticamente poblaciones de *Boana xerophyllus*, donde se describe la variación fenotípica (tamaño y llamadas) geográfica de esta especie a lo largo del Valle del Magdalena en el Departamento del Tolima (Colombia). Esta variación tiene un patrón clinal positivo asociado al gradiente de altitud, con individuos grandes a mayor altitud y un efecto pleiotrópico negativo sobre la frecuencia en la llamada.

Este patrón de diversificación fenotípica contrasta con la ausencia de estructura genética en las secuencias mitocondriales, y por la presencia de flujo génico entre las poblaciones. No obstante, se documentó divergencia entre las poblaciones de *B. xerophyllus* descritas originalmente en Guyana y de otras poblaciones de Colombia. Así, se confirma que *B. xerophyllus* no es una única especie con amplia distribución, y que se requiere de una extensa revisión filogenética y filogeográfica; lo que probablemente revelará un complejo de especies crípticas.

Los patrones contrastantes entre la diferenciación fenotípica y el flujo genético observado a través de SNPs y secuencias mitocondriales en *B. xerophyllus* a lo largo del gradiente de altitud sugieren que la selección debe ser lo suficientemente fuerte para mantener dicho balance. Por lo tanto, es posible sugerir que la arquitectura genómica de esta especie presenta ciertos loci significativamente involucrados en rasgos cuantitativos.

Aunque no es posible determinar bajo qué tipo de selección están actuando los loci identificados como candidatos, la evidencia en conjunto sobre el patrón de mezcla genética clinal y diversificación fenotípica, de loci candidatos a selección, y de aislamiento por ambiente, sugiere efectos adaptativos climáticos en las poblaciones estudiadas de *B. xerophyllus*.

## Referencias

- Abebe, T.D., Naz, A.A. & Léon, J., 2015. Landscape genomics reveal signatures of local adaptation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00813/abstract>.
- Acosta-Galvis, A., 2012. Anfibios de los enclaves secos del área de influencia de los Montes de María y la Ciénaga de La Caimanera, departamento de Sucre, Colombia. *Biota Colombiana*, 13(2), pp.211–231.
- Adams, D.C. & Church, J.O., 2008. Amphibians do not follow Bergmann's rule. *Evolution*, 62(2), pp.413–420.
- Aguillon, S. et al., 2016. Deconstructing isolation-by-distance: the genomic consequences of limited dispersal. *bioRxiv*, pp.1–39.
- Aguirre-Liguori, J.A. et al., 2017. Connecting genomic patterns of local adaptation and niche suitability in teosintes. *Molecular Ecology*, 26(16), pp.4226–4240.
- Amézquita, A. et al., 2009. Calls, colours, shape, and genes: A multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(4), pp.826–838.
- Ashton, K.G., 2002. Do amphibians follow Bergmann's rule? *Canadian Journal of Zoology*, 80(1960), pp.708–716.
- Baker, M., 2012. De novo genome assembly: what every biologist should know. *Nature Methods*, 9(4), pp.333–337. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.1935>.
- Balding, D., 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*, 7(10), pp.781–791. Available at: <http://www.nature.com/nrg/journal/v7/n10/abs/nrg1916.html>.
- Balkenhol, N. et al., 2015. *Landscape genetics: concepts, methods, applications* First Edit., Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- Barbault, R., 1988. Body Size, Ecological Constraints, and the Evolution of Life-History Strategies. *Evolutionary Biology*, (258), pp.261–286. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-0931-4\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-0931-4_6).
- Barrow, L.N. et al., 2014. Species tree estimation of North American chorus frogs (Hylidae: *Pseudacris*) with parallel tagged amplicon sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75(1), pp.78–90.
- Bass, Jds., Dabney, A. & Robinson, D., 2015. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. *R package version 2.8.0*. Available at: <http://github.com/jdstorey/qvalue>.
- Bell, R.C., Drewes, R.C. & Zamudio, K.R., 2015. Reed frog diversification in the Gulf of Guinea: Overseas dispersal, the progression rule, and in situ speciation. *Evolution*, 69(4), pp.904–915.
- Bernal, M.H., Montealegre, D.P. & Páez, C.A., 2004. Estudio de la vocalización de trece especies de anuros del municipio de ibagué, colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 28(108), pp.385–390.
- Bernal, X.E., Guarnizo, C. & Lüddecke, H., 2005. Geographic Variation in Advertisement Call and Genetic Structure of *Colostethus Palmatus* (Anura, Dendrobatidae) From the Colombian Andes. *Herpetologica*, 61(4), pp.395–408.
- Blair, W.F., 1972. *Evolution in the genus Bufo*, Austin: University of Texas Press. Available at: <https://www.jstor.org/stable/41316980>.
- Blanquart, F. et al., 2013. A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology Letters*, 16(9), pp.1195–1205.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), pp.2114–2120.
- Boul, K.E. et al., 2007. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), pp.399–406. Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2006.3736>.
- Bradburd, G.S., Ralph, P.L. & Coop, G.M., 2013. Disentangling the effects of geographic and

- ecological isolation on genetic differentiation. *Evolution*, 67(11), pp.3258–3273.
- Brelsford, A., Dufresnes, C. & Perrin, N., 2016. High-density sex-specific linkage maps of a European tree frog (*Hyla arborea*) identify the sex chromosome without information on offspring sex. *Heredity*, 116(2), pp.177–181. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/hdy.2015.83>.
- Brochero, H. et al., 2010. Genetic structure of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *marajoara* (Diptera: Culicidae) in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(3), pp.585–595.
- Brooks, C.P., 2003. A scalar analysis of landscape connectivity. *Oikos*, 102(2), pp.433–439.
- Cadena, C.D., Klicka, J. & Ricklefs, R.E., 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: Molecular phylogenetics and phylogeography of Buarremon brush-finches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, pp.993–1016.
- Chan, K.O. et al., 2017. Species delimitation with gene flow: A methodological comparison and population genomics approach to elucidate cryptic species boundaries in Malaysian Torrent Frogs. *Molecular Ecology*. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/mec.14296>.
- Corander, J. et al., 2013. BAPS : Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v 6.0. *Bioinformatics*, pp.1–28.
- Creech, T.G. et al., 2017. Simulating the spread of selection-driven genotypes using landscape resistance models for desert bighorn sheep. *PLoS ONE*, 12(5).
- Darriba, D. et al., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), pp.772–772. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2109>.
- Davey, J. et al., 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), pp.499–510. Available at: <papers://1bc19a7c-6e6a-4594-831a-36d8c340e116/Paper/p2562>.
- Doebeli, M., 2005. Adaptive speciation when assortative mating is based on female preference for male marker traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(6), pp.1587–1600.
- Doty, G. V. & Welch, A.M., 2001. Advertisement call duration indicates good genes for offspring feeding rate in gray tree frogs (*Hyla versicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(2–3), pp.150–156.
- Dreher, C.E. & Pröhl, H., 2014. Multiple sexual signals: calls over colors for mate attraction in an aposematic, color-diverse poison frog. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2(June 2014), pp.1–10. Available at: [http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fevo.2014.00022/full?utm\\_source=newsletter&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=Ecology\\_and\\_Evolution-w28-2014%5Cnpapers2://publication/doi/10.3389/fevo.2014.00022/abstract](http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fevo.2014.00022/full?utm_source=newsletter&utm_medium=email&utm_campaign=Ecology_and_Evolution-w28-2014%5Cnpapers2://publication/doi/10.3389/fevo.2014.00022/abstract).
- Duellman, W.E., 1970. The Hylid frogs of middle America. In *Monograph of the museum of natural history*. The University of Kansas, pp. 1–749.
- Duellman, W.E. & Trueb, L., 1994. *Biology of amphibians*, Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Duméril, A.M.C. & Bibron, G., 1841. *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles*. *Librarie Encyclopedique de Roret*, 8.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), pp.1792–1797.
- Egger, B. et al., 2008. Assortative mating preferences between colour morphs of the endemic Lake Tanganyika cichlid genus *Tropheus*. In *Hydrobiologia*. pp. 37–48.
- Elmer, K.R., Lehtonen, T.K. & Meyer, A., 2009. Color assortative mating contributes to sympatric divergence of neotropical cichlid fish. *Evolution*, 63(10), pp.2750–2757.
- Elshire, R.J. et al., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5), pp.1–10.
- Emerson, S.B., 1978. Allometry and Jumping in Frogs: Helping the Twain to Meet. *Evolution*, 32(3), p.551. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2407721?origin=crossref>.

- Ey, E. & Fischer, J., 2009. "The acoustic adaptation hypothesis" - A review of the evidence for anurans, birds and mammals. *Bioacoustics*, 19(1–2), pp.21–48. Available at: [papers2://publication/uuid/AA063960-5BA9-4A67-BDB8-247832EC9984](https://papers2://publication/uuid/AA063960-5BA9-4A67-BDB8-247832EC9984).
- Foll, M. & Gaggiotti, O., 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics*, 180(2), pp.977–993.
- Forester, B.R. et al., 2016. Detecting spatial genetic signatures of local adaptation in heterogeneous landscapes. *Molecular Ecology*, 25(1), pp.104–120.
- Frichot, E. et al., 2014. Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. *Genetics*, 196(4), pp.973–983.
- Frichot, E. et al., 2013. Testing for associations between loci and environmental gradients using latent factor mixed models. *Molecular Biology and Evolution*, 30(7), pp.1687–1699.
- Frichot, E. & François, O., 2015. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), pp.925–929.
- Funk, W.C. et al., 2016. Elevational speciation in action? Restricted gene flow associated with adaptive divergence across an altitudinal gradient. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(2), pp.241–252.
- Galeano, S.P. & Harms, K.E., 2016. Coloration in the polymorphic frog *Oophaga pumilio* associates with level of aggressiveness in intraspecific and interspecific behavioral interactions. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(1), pp.83–97.
- Gerhardt, H.C., 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42(4), pp.615–635.
- Gerhardt, H.C. et al., 2000. Female preference functions based on call duration in the gray tree frog (*Hyla versicolor*). *Behavioral Ecology*, 11(6), pp.663–669.
- Goudet, J., 2005. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), pp.184–186.
- Gregory, T.R., 2017. Animal Genome Size Database.
- Gregory, T.R., 2003. Variation across amphibian species in the size of the nuclear genome supports a pluralistic, hierarchical approach to the C-value enigma. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(2), pp.329–339.
- Griswold, C.K., 2006. Gene flow's effect on the genetic architecture of a local adaptation and its consequences for QTL analyses. *Heredity*, 96(6), pp.445–453.
- Grummer, J.A. & Leaché, A.D., 2017. Do dams also stop frogs? Assessing population connectivity of coastal tailed frogs (*Ascaphus truei*) in the North Cascades National Park Service Complex. *Conservation Genetics*, 18(2), pp.439–451.
- Guarnizo, C.E. et al., 2015. DNA barcoding survey of anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the impact of the andes on cryptic diversity. *PLoS ONE*, 10(5), pp.1–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127312>.
- Guo, B. et al., 2016. Genomewide scan for adaptive differentiation along altitudinal gradient in the Andrew's toad *Bufo andrewsi*. *Molecular ecology*, 25(16), pp.3884–3900.
- Gutiérrez-Pinto, N. et al., 2012. Non-monophyly and deep genetic differentiation across low-elevation barriers in a Neotropical montane bird (*Basileuterus tristriatus*; Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64, pp.156–165.
- Hall, L.A. & Beissinger, S.R., 2014. A practical toolbox for design and analysis of landscape genetics studies. *Landscape Ecology*, 29(9), pp.1487–1504.
- Hamilton, M.B., 2009. *Population genetics* First edit., Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- Hammond, S.A. et al., 2017. The North American bullfrog draft genome provides insight into hormonal regulation of long noncoding RNA. *Nature Communications*, 8(1).
- Hasegawa, Y., Ueda, H. & Sumida, M., 1999. Clinal geographic variation in the advertisement call of the wrinkled frog, *Rana rugosa*. *Herpetologica*, 55(3), pp.318–324.
- Heard, G.W., Canessa, S. & Parris, K.M., 2015. Interspecific variation in the phenology of advertisement calling in a temperate Australian frog community. *Ecology and Evolution*, 5(18),

- pp.3927–3938.
- Hedrick, P.W., 2010. *Genetics Of Populations* Fourth Edi., Jones & Bartlett Learning.
- Hellsten, U. et al., 2010. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5978), pp.633–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431018>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2994648>.
- Hidalgo, O. et al., 2017. Is There an Upper Limit to Genome Size? *Trends in Plant Science*, 22(7), pp.567–573.
- Hijmans, R.J. et al., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25(15), pp.1965–1978.
- Hoban, S. et al., 2016. Finding the Genomic Basis of Local Adaptation: Pitfalls, Practical Solutions, and Future Directions. *The American Naturalist*, 188(4), pp.379–397. Available at: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/688018>.
- Holderegger, R., Kamm, U. & Gugerli, F., 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: Implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), pp.797–807.
- Hsu, F.-H. et al., 2014. Altitudinal variation in body size and age structure of the Sauter's frog *Rana sauteri* in Taiwan. *Zoological Studies*, 53(62), pp.1–9.
- Jang, Y. et al., 2011. Geographic variation in advertisement calls in a tree frog species: Gene flow and selection hypotheses. *PLoS ONE*, 6(8).
- Jiang, H. et al., 2014. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics*, 15(1), p.182.
- Jiang, Z. et al., 2016. Genome wide sampling sequencing for SNP genotyping: Methods, challenges and future development. *International Journal of Biological Sciences*, 12(1), pp.100–108.
- Jombart, T. & Ahmed, I., 2011. adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), pp.3070–3071.
- Kawecki, T.J. & Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12), pp.1225–1241.
- Kearse, M. et al., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), pp.1647–1649.
- Kerschbaumer, M., Mitteroecker, P. & Sturmbauer, C., 2014. Evolution of body shape in sympatric versus non-sympatric *Tropheus* populations of Lake Tanganyika. *Heredity*, 112(2), pp.89–98. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/hdy.2013.78>.
- Kime, N.M., Turner, W.R. & Ryan, M.J., 2000. The transmission of advertisement calls in Central American frogs. *Behavioral Ecology*, 11(1), pp.71–83. Available at: <http://beheco.oxfordjournals.org/content/11/1/71.abstract>.
- Kluge, A.G., 1979. The Gladiator frogs of middle America and Colombia - A reevaluation of their systematics (Anura: Hylidae). *Occasional Papers of the Museum of Zoology*, (688), pp.1–24.
- Korneliussen, T.S., Albrechtsen, A. & Nielsen, R., 2014. ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics*, 15(1), p.356. Available at: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-014-0356-4>.
- De Kort, H. et al., 2014. Landscape genomics and a common garden trial reveal adaptive differentiation to temperature across Europe in the tree species *Alnus glutinosa*. *Molecular Ecology*, 23(19), pp.4709–4721.
- Krizmanic, I., Vukov, T.D. & Kalezić, M.L., 2005. Bergmann's rule is size-related in European newts (*Triturus*). *Herpetological Journal*, 15(3), pp.205–206.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp.1870–1874. Available at: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msw054>.
- Lambert, M.R., Skelly, D.K. & Ezaz, T., 2016. Sex-linked markers in the North American green frog (*Rana clamitans*) developed using DArTseq provide early insight into sex chromosome evolution. *BMC Genomics*, 17(1), p.844. Available at:

- <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3209-x>.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), pp.357–9. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22388286>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3322381>.
- Laugen, A.T. et al., 2005. Do common frogs (*Rana temporaria*) follow Bergmann's rule? *Evolutionary Ecology Research*, 7(5), pp.717–731.
- Lee, K.H. et al., 2016. Geographic variation in advertisement calls of a Microhylid frog - testing the role of drift and ecology. *Ecology and Evolution*, 6(10), pp.3289–3298.
- Leigh, J.W. & Bryant, D., 2015. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), pp.1110–1116.
- Librado, P. & Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), pp.1451–1452.
- Link, A. et al., 2015. Phylogeography of the Critically Endangered Brown Spider Monkey (*Ateles hybridus*): Testing the Riverine Barrier Hypothesis. *International Journal of Primatology*, 36(3), pp.530–547.
- Lischer, H.E.L. & Excoffier, L., 2012. PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), pp.298–299.
- Luddecke, H. & Sanchez, O., 2002. Are Tropical Highland Frog Calls Cold-adapted? The Case of the Andean Frog *Hyla labialis*. *Biotropica*, 34(2), pp.281–288. Available at:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7429.2002.tb00539.x>.
- Luu, K., Bazin, E. & Blum, M.G.B., 2017. pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), pp.67–77.
- Lynch, J. & Suárez-Mayorga, A.M., 2001. The distribution of the gladiator frogs (*Hyla Boans* Group) in Colombia, with comments on size variation and sympatry. *Caldasia*, 23(2), pp.491–507.
- Ma, J. & Amos, C.I., 2012. Principal components analysis of population admixture. *PLoS ONE*, 7(7).
- Manel, S. & Holderegger, R., 2013. Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(10), pp.614–621.
- Marques, D.A. et al., 2017. Genomic landscape of early ecological speciation initiated by selection on nuptial colour. *Molecular Ecology*, 26(1), pp.7–24.
- Marques, D.A. et al., 2016. Genomics of Rapid Incipient Speciation in Sympatric Threespine Stickleback. *PLoS Genetics*, 12(2).
- Mazzarella, A.B. et al., 2016. Genomic signatures of the plateless phenotype in the threespine stickleback. *Ecology and Evolution*, 6(10), pp.3161–3173.
- McCartney-Melstad, E., Gidi, M. & Shaffer, H.B., 2017. Population Genomics of the Foothill Yellow-Legged Frog (*Rana boylei*) and RADseq Parameter Choice for Large-Genome Organisms. *PREPRINT revisar*.
- Mckenna, A. et al., 2010. The Genome Analysis Toolkit : A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data The Genome Analysis Toolkit : A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, pp.0–7.
- McLister, J.D., Stevens, E.D. & Bogart, J.P., 1995. Comparative contractile dynamics of calling and locomotor muscles in three hylid frogs. *The journal of experimental biology*, 198, pp.1527–1538.
- Medina, I. et al., 2013. Hybridization promotes color polymorphism in the aposematic harlequin poison frog, *Oophaga histrionica*. *Ecology and Evolution*, 3(13), pp.4388–4400.
- Merkel, D., 2014. Docker: lightweight Linux containers for consistent development and deployment. *Linux Journal*, 2014(239), p.2. Available at:  
[http://dl.acm.org/ft\\_gateway.cfm?id=2600241&type=html%5Cnhttp://www.linuxjournal.com/content/docker-lightweight-linux-containers-consistent-development-and-deployment](http://dl.acm.org/ft_gateway.cfm?id=2600241&type=html%5Cnhttp://www.linuxjournal.com/content/docker-lightweight-linux-containers-consistent-development-and-deployment).
- Miller, M.R. et al., 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using

- restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17(2), pp.240–248.
- Muñoz-Ortiz, A. et al., 2015. Of peaks and valleys: Testing the roles of orogeny and habitat heterogeneity in driving allopatry in mid-elevation frogs (Aromobatidae: Rheobates) of the northern Andes. *Journal of Biogeography*, 42(1), pp.193–205.
- Narins, P.M. et al. eds., 2007. *Hearing and Sound Communication in Amphibians*, Springer Science+Business Media, LLC.
- Narins, P.M. & Smith, S.L., 1986. Clinal variation in anuran advertisement calls: basis for acoustic isolation? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19(2), pp.135–141.
- Nielsen, E.E. et al., 2009. Genomic signatures of local directional selection in a high gene flow marine organism; the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), p.276. Available at: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-9-276>.
- Noonan, B.P. & Comeault, A.A., 2009. The role of predator selection on polymorphic aposematic poison frogs. *Biology Letters*, 5(1), pp.51–54. Available at: <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsbl.2008.0586>.
- Norris, L.C. et al., 2015. Adaptive introgression in an African malaria mosquito coincident with the increased usage of insecticide-treated bed nets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), pp.815–820. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1418892112>.
- Nosil, P., 2012. *Ecological speciation* First., Oxford: Oxford University Press.
- Nowoshilow, S. et al., 2018. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, 000, pp.1–7.
- O'Neill, E.M. & Beard, K.H., 2011. Clinal Variation in Calls of Native and Introduced Populations of *Eleutherodactylus coqui*. *Copeia*, 1(1), pp.18–28.
- Olalla-Tárraga, M.Á. & Rodríguez, M.Á., 2007. Energy and interspecific body size patterns of amphibian faunas in Europe and North America: Anurans follow Bergmann's rule, urodeles its converse. *Global Ecology and Biogeography*, 16(5), pp.606–617.
- Orr, H.A., 2005. The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), pp.119–127.
- Orrico, V.G.D. et al., 2017. Integrative taxonomy supports the existence of two distinct species within *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae). *Salamandra*, 53(1), pp.99–113.
- Patterson, N., Price, A.L. & Reich, D., 2006. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genetics*, 2(12), pp.2074–2093.
- Pettitt, B.A., Bourne, G.R. & Bee, M.A., 2013. Advertisement Call Variation in the Golden Rocket Frog (*Anomaloglossus beebei*): Evidence for Individual Distinctiveness. *Ethology*, 119(3), pp.244–256.
- Pizano, C. & García, H., 2014. *El Bosque Seco Tropical en Colombia* Primera. C. Pizano & H. García, eds., Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).
- Plummer, M. et al., 2006. CODA: convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R News*, 6(March), pp.7–11. Available at: [http://cran.r-project.org/doc/Rnews/Rnews\\_2006-1.pdf#page=7](http://cran.r-project.org/doc/Rnews/Rnews_2006-1.pdf#page=7).
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp.945–959.
- Pröhl, H. et al., 2007. Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology*, 113(9), pp.825–837.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- Raj, A., Stephens, M. & Pritchard, J.K., 2014. FastSTRUCTURE: Variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics*, 197(2), pp.573–589.
- Rambaut, A., 2014. FigTree. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A. et al., 2014. Tracer. Available at: <http://code.google.com/p/beast-mcmc/>.
- Rellstab, C. et al., 2015. A practical guide to environmental association analysis in landscape

- genomics. *Molecular Ecology*, 24(17), pp.4348–4370.
- Reynolds, R.G. & Fitzpatrick, B.M., 2007. Assortative mating in poison-dart frogs based on an ecologically important trait. *Evolution*, 61(9), pp.2253–2259.
- Richardson, J.L. et al., 2016. Navigating the pitfalls and promise of landscape genetics. *Molecular Ecology*, 25(4), pp.849–863.
- Rodríguez, A. et al., 2017. Genomic and phenotypic signatures of climate adaptation in an Anolis lizard. *Ecology and Evolution*, 7(16), pp.6390–6403.
- Rodríguez, A., de la Nuez, D. & Alonso, R., 2010. Intraspecific Variation in the Advertisement Call of the Cloud-Forest Frog *Eleutherodactylus glamyrus* (Anura: Eleutherodactylidae). *Journal of Herpetology*, 44(3), pp.457–466.
- Rodriguez, M. et al., 2015. Landscape genetics, adaptive diversity and population structure in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist*, p.n/a-n/a. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.13713/abstract%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/nph.13713/asset/nph13713.pdf?v=1&t=igrjcuie&s=269271622d327e29aa5e630b23b2e78d28c8c981>.
- Ronquist, F. et al., 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), pp.539–542.
- Root & Hall, 1930. The influence of humidity on the body temperature of certain poikilotherms. *The Biological Bulletin*, 58(1), pp.152–158.
- Rundle, H.D. & Nosil, P., 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), pp.336–352.
- Rundle, H.D. & Nosil, P., 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), pp.336–352. Available at: [isi:000227249400012](http://www.isi.com/doi/10.1111/nph.13713/asset/nph13713.pdf).
- Ryan, M.J. & Wilczynski, W., 1991. Evolution of intraspecific variation in the advertisement call of a cricket frog (*Acris crepitans*, Hylidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 44(3), pp.249–271.
- Saltz, J.B., Hessel, F.C. & Kelly, M.W., 2017. Trait Correlations in the Genomics Era. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(4), pp.279–290.
- Sandoval-H, J., Gómez, J.P. & Cadena, C.D., 2017. Is the largest river valley west of the Andes a driver of diversification in Neotropical lowland birds? *The Auk*, 134(1), pp.168–180. Available at: <http://www.bioone.org/doi/10.1642/AUK-16-91.1>.
- Sarkar, D., 2008. *Lattice multivariate data visualization with R* First., New York: Springer. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-75969-2>.
- Savolainen, O., Lascoux, M. & Merilä, J., 2013. Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 14(11), pp.807–820. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3522>.
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T. & Knürr, T., 2007. Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), pp.595–619. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095646>.
- Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(7), pp.372–380.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2089>.
- Session, A.M. et al., 2016. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), pp.336–343.
- Singhal, S., 2013. De novo transcriptomic analyses for non-model organisms: An evaluation of methods across a multi-species data set. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), pp.403–416.
- Slatkin, M., 1978. Spatial patterns in the distributions of polygenic characters. *Journal of Theoretical Biology*, 70(2), pp.213–228.
- Sobel, J.M. et al., 2010. The biology of speciation. *Evolution*, 64(2), pp.295–315.
- Solano, L., Lizcano, D.J. & Mercado-Gomez, J., 2015. Selection of calling sites by the Neotropical treefrog *Hypsiboas crepitans*. *Rev. Biodivers. Neotrop.*, 5(1), pp.71–75.

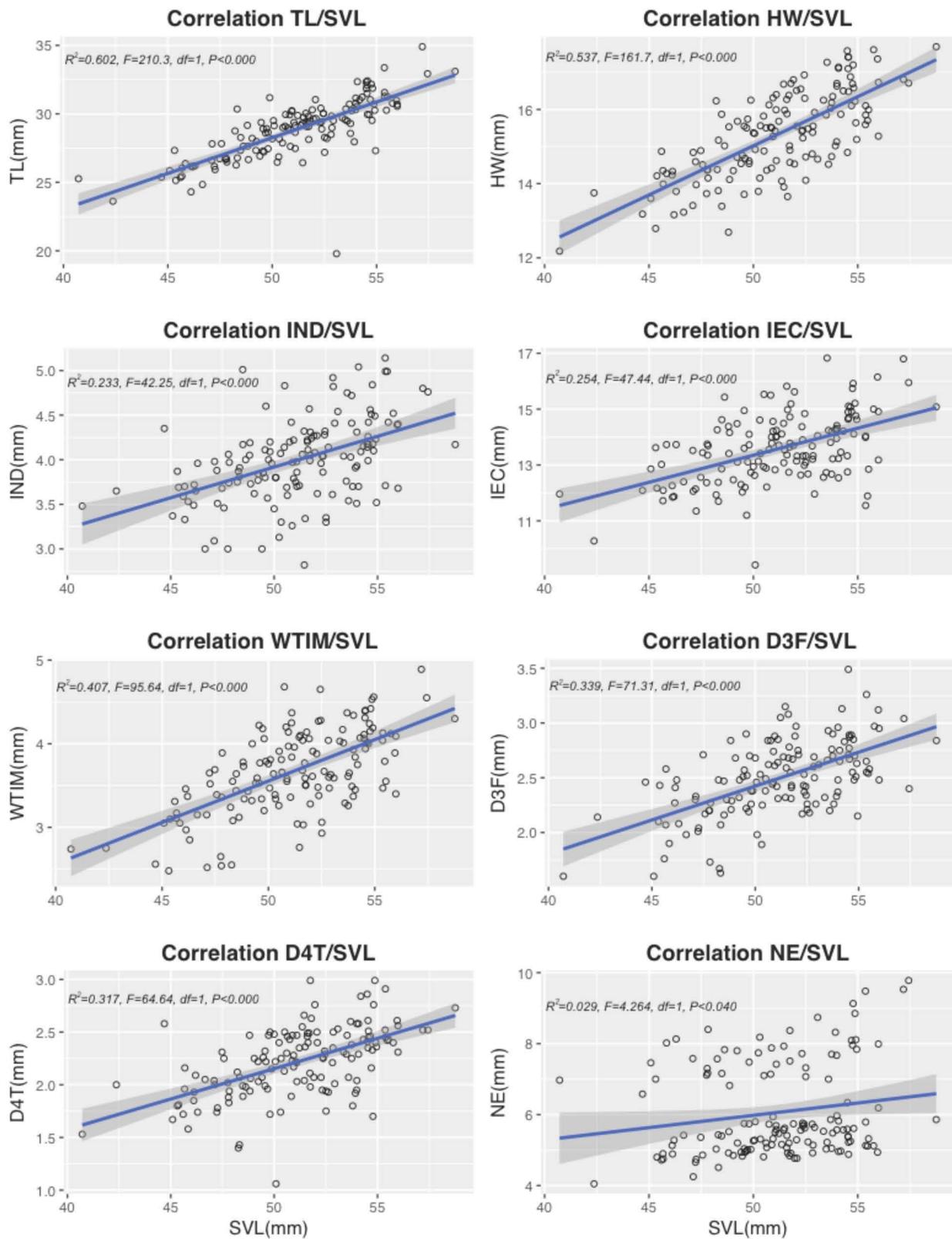
- Soria-Carrasco, V. et al., 2014. Stick Insect Genomes Reveal Natural Selection's Role in Parallel Speciation. *Science*, 344(6185), pp.738–742. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1252136>.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), pp.1312–1313.
- Streicher, J.W. et al., 2014. Diversification and asymmetrical gene flow across time and space: Lineage sorting and hybridization in polytypic barking frogs. *Molecular Ecology*, 23(13), pp.3273–3291.
- Stuart, Y.E. & Losos, J.B., 2013. Ecological character displacement: Glass half full or half empty? *Trends in Ecology and Evolution*, 28(7), pp.402–408.
- Sun, Y.-B. et al., 2015. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), pp.E1257–E1262. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1501764112>.
- Termignoni-García, F. et al., 2017. Genomic footprints of adaptation in a cooperatively breeding tropical bird across a vegetation gradient. *Molecular Ecology*, 26(17), pp.4483–4496.
- The Cornell Lab of Ornithology, 2014. Raven Pro: : Interactive Sound Analysis Software. Available at: <http://www.birds.cornell.edu/raven>.
- Thomé, M.T.C. & Carstens, B.C., 2016. Phylogeographic model selection leads to insight into the evolutionary history of four-eyed frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), pp.8010–8017. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1601064113>.
- Tigano, A. & Friesen, V.L., 2016. Genomics of local adaptation with gene flow. *Molecular Ecology*, 25, pp.2144–2164. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/mec.13606>.
- Triana Velásquez, T.M., Henao Muñoz, L.M. & Bernal Bautista, M.H., 2016. Toxicidad del herbicida Propanil (Propanil Trust® 500EC) en embriones y renacuajos de tres especies de anuros. *Acta Biológica Colombiana*, 21(3), p.627. Available at: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/54845>.
- Twomey, E., Mayer, M. & Summers, K., 2015. Intraspecific Call Variation in the Mimic Poison Frog *Ranitomeya imitator*. *Herpetologica*, 71(4), pp.252–259. Available at: <http://dx.doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-15-00004>.
- Twomey, E., Vestergaard, J.S. & Summers, K., 2014. Reproductive isolation related to mimetic divergence in the poison frog *Ranitomeya imitator*. *Nature Communications*, 5, p.4749. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms5749>.
- Valderrama, E. et al., 2014. The influence of the complex topography and dynamic history of the montane Neotropics on the evolutionary differentiation of a cloud forest bird (*Premnoplex brunnescens*, Furnariidae). *Journal of Biogeography*, 41(8), pp.1533–1546.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S* Fourth edi., Springer. Available at: [www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/VR4stat.pdf](http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/VR4stat.pdf).
- Verdu, P. et al., 2009. Origins and Genetic Diversity of Pygmy Hunter-Gatherers from Western Central Africa. *Current Biology*, 19(4), pp.312–318.
- De Villemeureuil, P. et al., 2014. Genome scan methods against more complex models: When and how much should we trust them? *Molecular Ecology*, 23(8).
- Wang, I.J. & Bradburd, G.S., 2014. Isolation by environment. *Molecular Ecology*, 23(23), pp.5649–5662.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), p.1358. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2408641?origin=crossref>.
- Wells, K.D., 2007a. *The Ecology and Behavior of Amphibians*, University Of Chicago Press.
- Wells, K.D., 2007b. *The Ecology and Behavior of Amphibians*, Chicago and London: The University of Chicago Press.
- Wickham, H., 2009. *ggplot2 Elegant Graphic for Data Analysis* First., Springer.

- Wilson, M.C. et al., 2016. Habitat fragmentation and biodiversity conservation: key findings and future challenges. *Landscape Ecology*, 31(2), pp.219–227. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10980-015-0312-3>.
- Wright, S., 1943. Isolation by Distance. *Genetics*, 28(2), pp.114–138.
- Yeaman, S. & Otto, S.P., 2011. Establishment and maintenance of adaptive genetic divergence under migration, selection, and drift. *Evolution*, 65(7), pp.2123–2129.
- Zachos, F.E. & Habel, J.C. eds., 2011. *Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas*, New York: Springer Heidelberg Dordrecht.
- Zhou, Y.-L. et al., 2014. Acoustic characteristics of eight common Chinese anurans during the breeding season. *Zoological Research*, 35(1), pp.42–50. Available at: <http://www.zoores.ac.cn/CN/article/downloadArticleFile.do?attachType=PDF&id=3428>.

## Anexos

**Tabla S1.** Resumen de las nueve medidas morfológicas en los tres rangos altitudinales para *B. xerophyllus*. Los parámetros están dados en milímetros. Ver descripción de las medidas en la sección análisis morfológico.

Parameter		Altitude range		
		A (< 500 m)	B (501 - 1000 m)	C (> 1001 m)
SVL	N	48	61	32
	Range	40.72-55.99	45.32-55.99	44.69-58.76
	X	49.47	51.39	53.18
	SD	3.38	2.57	2.87
TL	Range	23.62-32.16	25.14-32.41	19.79-34.90
	X	27.5	29.37	29.9
	SD	1.78	1.67	2.57
IND	Range	2.82-5.01	3.00-5.04	4.00-5.14
	X	3.79	3.93	4.43
	SD	0.46	0.36	0.34
HW	Range	12.18-17.20	12.79-17.58	12.69-17.69
	X	14.7	15.6	15.72
	SD	1.03	1.01	1.28
WTIM	Range	2.52-4.56	2.48-4.68	2.56-4.89
	X	3.33	3.85	3.83
	SD	0.46	0.4	0.48
IEC	Range	10.28-15.92	9.42-15.11	11.55-16.83
	X	13.39	13.29	14.38
	SD	1.28	0.95	1.36
NE	Range	4.05-9.13	4.72-8.40	4.77-9.78
	X	6.7	5.54	6.08
	SD	1.37	0.73	1.61
D3F	Range	1.60-3.15	1.63-3.49	2.40-3.12
	X	2.27	2.55	2.71
	SD	0.31	0.33	0.2
D4T	Range	1.40-2.66	1.06-2.91	2.32-2.99
	X	1.99	2.24	2.54
	SD	0.25	0.31	0.16

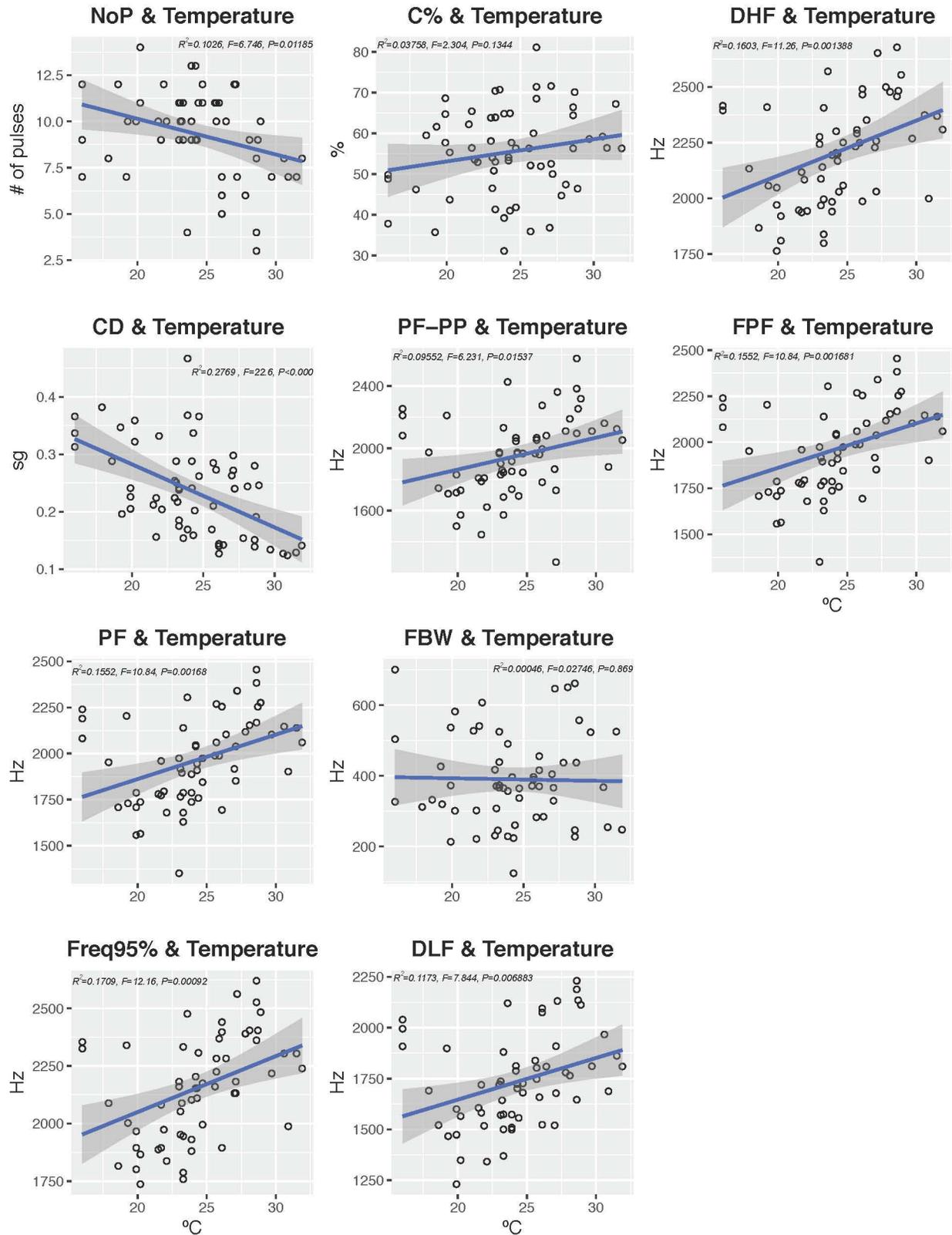


**Figura S1.** Autocorrelación entre todos los parámetros morfológicos y la longitud del cuerpo (SVL) en *B. xerophyllus*. Para ver una descripción detallada de los parámetros ver la sección de análisis morfológicos.

**Tabla S2.** Resumen de los resultados acústicos para los 17 parámetros medidos en los tres rangos altitudinales en *B. xerophyllus*. Los parámetros CD y D-PP están dados en segundos, los demás parámetros en kHz. Para ver una descripción de los parámetros ver la sección de análisis acústico.

Parámetro		Rango altitudinal		
		A (< 500 m)	B (501 - 1000 m)	C (> 1001 m)
NoP	N	17	16	28
	Range	3-10	9-13	7-14
	X	7	11	10
	SD	2	1	2
CD	Range	0.12-0.28	0.14-0.37	0.16-0.47
	X	0.17	0.25	0.27
	SD	0.05	0.05	0.08
PF	Range	1.69-2.45	1.77-2.27	1.35-2.24
	X	2.18	1.99	1.82
	SD	0.18	0.13	0.2
DLF	Range	1.52-2.23	1.52-1.91	1.23-2.04
	X	1.94	1.74	1.61
	SD	0.22	0.11	0.19
DHF	Range	1.99-2.68	1.97-2.41	1.76-2.42
	X	2.43	2.21	2.07
	SD	0.2	0.12	0.19
IQR-BW	Range	0.10-0.23	0.09-0.62	0.09-0.40
	X	0.15	0.2	0.16
	SD	0.03	0.14	0.08
Freq95%	Range	1.89-2.62	1.95-2.37	1.74-2.35
	X	2.35	2.17	2.02
	SD	0.19	0.11	0.19
BW90	Range	0.24-0.72	0.24-1.19	0.21-1.17
	X	0.39	0.48	0.4
	SD	0.14	0.31	0.2
Call%	Range	44.7-81.1	35.9-71.6	31.10-70.40
	X	60.9	51	54.6
	SD	10.3	9	10.7
PF-PP	Range	1.78-2.58	1.27-2.13	1.45-2.25
	X	2.18	1.92	1.83
	SD	0.2	0.21	0.21
D-PP	Range	0.02-0.04	0.02-0.03	0.02-0.03
	X	0.02	0.02	0.02
	SD	0.01	0	0
FPF	Range	0.60-1.26	0.60-0.88	0.52-1.05
	X	0.98	0.73	0.72

	SD	0.19	0.09	0.14
FLF	Range	0.46-1.15	0.46-0.75	0.52-1.05
	X	0.78	0.57	0.72
	SD	0.22	0.09	0.14
FHF	Range	0.83-1.49	0.79-1.03	0.65-1.45
	X	1.22	0.92	0.93
	SD	0.18	0.07	0.19
F-BW90	Range	0.20-0.50	0.20-0.34	0.17-0.51
	X	0.34	0.28	0.31
	SD	0.09	0.04	0.1
FBW	Range	0.23-0.66	0.25-0.44	0.12-0.70
	X	0.43	0.36	0.38
	SD	0.14	0.05	0.14
F-IQR-BW	Range	0.09-0.27	0.09-0.16	0.07-0.22
	X	0.15	0.12	0.14
	SD	0.05	0.02	0.04



**Figura S2.** Autocorrelación entre los parámetros acústicos seleccionados y la temperatura en *B. xerophyllus*. Para ver una descripción detallada de los parámetros ir a análisis acústico.

**Tabla S3.** Descripción de parámetros para la limpieza, filtrado y llamado de SNPs para genética de poblaciones con RADToolKit v0.13.7

<b>A) preClean</b>	Reformatting raw fastq reads for "demultiplex"
<b>B) demultiplex</b>	De-multiplexing sequence reads (from folder pre-clean) for "filter"
<b>C) filter</b>	Initial filtering: non-RAD tags for "cleanPE" or "cleanSE"
<b>D) cleanPE</b>	Clean up PE raw data, which includes trimming for quality, low complexity, removing adapters, merging overlapping reads, reads sourced from contamination
<b>E) cleanSE</b>	Clean up SE raw data, which includes trimming for quality, low complexity, removing adapters, reads sourced from contamination
<b>F) clustertest</b>	Test various with-individual and between-individual clustering threshold
<b>G) contig</b>	Re-construct RAD loci for each individual
<b>H) popRad</b>	Concatenate RADs from all samples to make a reference, alignment using Bowtie2, indel-realignment using GATK, SNP filtering
<b>I) angsd</b>	Genotype calling, SNP calling and allele frequency estimate using ANGSD
<b>J) phyloRad</b>	Find and align orthologous RAD from all samples
<b>K) phyloRadOut</b>	Generate input files for various phylogenetic analyses RADTools for Population genetics: A, B, C, D, G, H, I
<b>A)</b>	RADTools preClean [options]
<b>-a</b>	DIR a folder with all raw reads
<b>-z</b>	use fastqc to evaluate quality of the raw reads?[True]
<b>B)</b>	RADTools demultiplex [options]
<b>-a</b>	DIR a folder with all raw reads
<b>-b</b>	FILE a file contain all indexes
<b>-p</b>	paired-end? [null]
<b>-d</b>	allow one mismatch? [null]
<b>C)</b>	RADTools filter [options]
<b>-a</b>	DIR a folder with raw reads if PE: AAA_R1.fq, AAA_R2.fq, BBB_R1.fq, BBB_R2.fq... if SE: AAA_R1.fq, BBB_R1.fq...
<b>-1</b>	CHAR RE recognition sequence for P1: required. For example sphi cuts between the second G and C for GCATGC. The you should give CATGC here
<b>-m</b>	INT maximum mismatches allowed in RE recognition sequence [1]
<b>-p</b>	Paired-end data? if no then do not use -p [null].
<b>D)</b>	RADTools cleanSE [options]
	External dependencies: "skewer", "bowtie2", "fastQC", "trimmomatic"
<b>-f</b>	DIR path to the folder of raw fastq files
<b>-o</b>	DIR path to the results folder
<b>-t</b>	FILE path to trimmoatic executable
<b>-c</b>	FILE contaminant file
<b>-m</b>	FLOAT percent similarity to contaminant file to consider a read to be a contaminant [0.90]
<b>-k</b>	INT number of threads needed for bowtie2 alignment (remove contamination), skewer (trimming adapters) and trimmomatic (trimming adapters and low qual) [4]
<b>-q</b>	INT quality trimming threshold [23]

**-d** CHAR the particular library that you like to process, if "all" is specified, all libraries in the folder (-f) will be processed sequentially [all]  
**-l** INT read length [100]  
**-n** FLOAT will get rid of reads for which more than n\*100\% of bases are NNs [0.6]  
**-r** FLOAT will get rid of reads with any runs of bases longer than r\*read\_length [0.5]  
**-h** INT trimmomatic trimming length cutoff [36]  
**-z** If z is supplied, use fastQC to evaluate cleaned sequence reads [null]

**G)** RADTools contig [options]

Options for single-end reads:

**-a** DIR a folder with all cleaned reads (AAA\_1\_final.fastq, BBB\_1\_final.fastq)  
**-E** INT 1 = population genetic dataset (mapping based). 2 = phylogenetic dataset (alignment based) [1]  
**-f** INT length of each forward read after trimming off RERS  
**-R** CHAR species used for repeatmasking. some examples are: human, mouse, rattus, "ciona savignyi", arabidopsis, mammal, carnivore, rodentia, rat, cow, pig, cat, dog, chicken, fugu, danio, "ciona intestinalis", drosophila, anopheles, elegans, diatocaea, artiodactyl, rice, wheat, maize, "vertebrata metazoa"  
**-t** INT number of threads used in clustering [10]  
**-m** INT memory limit (in MB) for the program, default 800; 0 for unlimited [0]  
**-c** FLOAT sequence identity threshold for clustering unpaired reads in cdhit [0.96]  
**-l** INT length of throw\_away\_RAD\_locus in cdhit [40]  
**-M** FLOAT discard a locus if M percent bases are Ns [0.6]  
**-p** Paired-end data? if no then do not use -p [p]

**H)** RADTools popRad [options]

**-a** DIR a folder with all unfiltered RAD files (AAA.unfiltered.fasta, BBB.unfiltered.fasta, CCC.unfiltered.fasta...) full path!!  
**-s** INT number of samples[96]  
**-b** DIR a folder that contains all cleaned reads. SE: AAA\_1\_final.fastq, BBB\_1\_final.fastq  
**-G** JAR GATK.jar (path)  
**-P** JAR Picard.jar (path)  
**-g** FLOAT percent identity for clustering among samples [0.9]  
**-c** FLOAT percent samples to share a locus, otherwise removed [0.7]  
**-C** INT length cutoff of throw-away markers [36]  
**-t** INT number of processors used for clustering [10]  
**-k** INT min number of individuals with less than -u INT coverage  
**-u** INT minimum individual coverage threshold used in -k  
**-d** INT minimum percentile site read depth [1]  
**-D** INT maximum percentile site read depth [99]  
**-Q** INT minimum RMS mapping quality for SNPS [10]  
**-S** FLOAT min p-value for strand bias [0] ## must be 0 for RAD data  
**-q** FLOAT min p-value for base quality bias [1e-100]  
**-f** FLOAT min p-value for map quality bias [0]  
**-e** FLOAT min p-value for end distance bias [0] muse be 0 for RAD data  
**-h** FLOAT min p-value for exact test of HWE [1e-4]  
**-h** FLOAT min p-value for exact test of excess of heterozygous [0]

---

**-H** FLOAT min p-value for exact test of defect of heterozygous [0]  
**-L** INT remove SNPs/sites within l bp upstream and downstream around an  
**-I** INDEL [10]  
**-x** CHAR p=paired-end, s=single-end [s]

**l)** RADTools angsd [options]  
 Basic:

**-b** FILE a file that contains names (and paths) of all BAM files (alignment) generated by the SamTools  
**-f** FILE a file that contains all sites to keep, file must end by ".keep"  
**-r** FILE reference fasta file used to align reads and generate BAM alignment files listed in a file after "-b"  
**-a** FILE ancestral file, if no ancestral file then just use reference fasta file for -a  
**-F** INT 1=folded 0=unfolded [1]. You have to do folded if an ancestral fasta is unavailable[1]  
**-Q** INT minimal Phred quality score to keep a base [20]  
**-q** INT minimal map quality [2]  
**-t** INT number of threads [4]  
**-g** INT genotype output options [2]  
 1 = print out major minor  
 2 = print the called genotype as 0,1,2 (used by Format\_converter.pl PCA)  
 4 = print the called genotype as AA, AC, AG,... (used by PopGenomics.pl geno\_to\_structure)  
 8 = print all 3 posts (major,major),(major,minor),(minor,minor)  
 16 = print the posterior of the called genotype  
 32 = somewhat different dumps the binary posterior for all samples, encoded as 3\*nind double  
 64 = all above

**-n** INT sample size[null]  
**-o** INT outfile Prefix[null]

Theta Estimate:

**-T** estimating per-site thetas? [null]  
 SNPVGenotype calling:

**-c** INT 1 = call genotypes; 0 = no[1]  
 if c = 1

**-P** FLOAT posterior prob cutoff for calling genotypes [0.95]  
**-e** INT 1 = estimate the posterior genotype probability based on the allele frequency as a prior. 2 = estimate the posterior genotype probability assuming a uniform prior [1]

**-h** INT min depth to call genotypes [5]  
**-d** INT discard site if effective sample size below value. 0 indicates no filtering [0]  
**-s** INT 1 = call SNPs; 0 = no [1]  
 if s = 1

**-v** FLOAT the p-value used for calling SNPs [1e-6]  
**-m** FLOAT remove sites with MAF below [0]

---

**Tabla S4.** Ciento noventa y una secuencias del gen COI y especies utilizadas para los análisis de relaciones filogenéticas.

Referencia	Etiqueta	Especie	Población	Núm. GenBank
Este estudio	Hxe_Arm097	<i>B. xerophyllus</i>	Armero	
	Hxe_Arm101	<i>B. xerophyllus</i>	Armero	
	Hxe_Arm102	<i>B. xerophyllus</i>	Armero	
	Hxe_Arm103	<i>B. xerophyllus</i>	Armero	
	Hpu_Arm098	<i>B. pugnax</i>	Armero	
	Hpu_Arm002	<i>B. pugnax</i>	Armero	
	Hxe_Ven005	<i>B. xerophyllus</i>	Venadillo	
	Hxe_Chi073	<i>B. xerophyllus</i>	Chicoral	
	Hxe_Chi074	<i>B. xerophyllus</i>	Chicoral	
	Hxe_Chi075	<i>B. xerophyllus</i>	Chicoral	
	Hxe_Chi076	<i>B. xerophyllus</i>	Chicoral	
	Hxe_Chi077	<i>B. xerophyllus</i>	Chicoral	
	Hxe_Pic007	<i>B. xerophyllus</i>	Picaleña	
	Hxe_Pic008	<i>B. xerophyllus</i>	Picaleña	
	Hxe_Pic095	<i>B. xerophyllus</i>	Picaleña	
	Hxe_Pic096	<i>B. xerophyllus</i>	Picaleña	
	Hxe_San011	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San012	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San013	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San014	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San016	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San017	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San104	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San105	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San106	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San107	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_San108	<i>B. xerophyllus</i>	San Jorge	
	Hxe_Orq018	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq019	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq020	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq021	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq022	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq023	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq024	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq025	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq026	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq079	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq080	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq083	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq084	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Orq085	<i>B. xerophyllus</i>	Orquídeas	
	Hxe_Cha110	<i>B. xerophyllus</i>	Chaparral	
	Hxe_Pla003	<i>B. xerophyllus</i>	Planadas	
	Hxe_Car088	<i>B. xerophyllus</i>	Carmen de Apicalá	
	Hpu_PuA046	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
	Hpu_PuA047	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
	Hpu_PuA048	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Hpu_PuA049	<i>B. pugnax</i>	Purificación A		
Hpu_PuA053	<i>B. pugnax</i>	Purificación A		
Hpu_PuA054	<i>B. pugnax</i>	Purificación A		
Hpu_PuA055	<i>B. pugnax</i>	Purificación A		
Hpu_PuA056	<i>B. pugnax</i>	Purificación A		
Hpu_PuA057	<i>B. pugnax</i>	Purificación A		

Hpu_PuA058	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Hpu_PuA059	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Hpu_PuA062	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Hpu_PuA063	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Hpu_PuA064	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Hpu_PuA065	<i>B. pugnax</i>	Purificación A	
Dmi_PuA060	<i>D. microcephalus</i>	Purificación A	
Dmi_PuA061	<i>D. microcephalus</i>	Purificación A	
Hpu_PuB090	<i>B. pugnax</i>	Purificación B	
Hpu_PuB091	<i>B. pugnax</i>	Purificación B	
Hpu_PuB092	<i>B. pugnax</i>	Purificación B	
Hpu_PuB093	<i>B. pugnax</i>	Purificación B	
Hpu_PuB094	<i>B. pugnax</i>	Purificación B	
Hxe_Pra028	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra029	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra030	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra031	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra032	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra033	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra036	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra039	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra040	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra042	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra044	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra045	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra066	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra067	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra068	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra069	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra070	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra071	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Pra072	<i>B. xerophyllus</i>	Prado	
Hxe_Gal117	<i>B. xerophyllus</i>	Galilea	
Hxe_Gal118	<i>B. xerophyllus</i>	Galilea	
Hxe_Gal119	<i>B. xerophyllus</i>	Galilea	
Hxe_Gal120	<i>B. xerophyllus</i>	Galilea	
Guarnizo et al. (2015)	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149120
Hxe_Sat001	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149197
Hxe_Sat002	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149215
Hxe_Sat003	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149265
Hxe_Sat004	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149095
Hxe_Sat005	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149269
Hxe_Sat006	<i>B. xerophyllus</i>	Santander	KP149145
Dmi_Sat001	<i>D. microcephalus</i>	Santander	KP149199
Dmi_Sat002	<i>D. microcephalus</i>	Santander	KP149173
Dmi_Sat003	<i>D. microcephalus</i>	Santander	KP149218
Dmi_Sat004	<i>D. microcephalus</i>	Santander	KP149130
Hpu_Sat001	<i>B. pugnax</i>	Santander	KP149212
Hpu_Sat002	<i>B. pugnax</i>	Santander	KP149204
Hpu_Sat003	<i>B. pugnax</i>	Santander	KP149101
Hpu_Sat004	<i>B. pugnax</i>	Santander	KP149266
Hxe_Boy001	<i>B. xerophyllus</i>	Boyacá	KP149256
Hxe_Boy002	<i>B. xerophyllus</i>	Boyacá	KP149176
Hxe_Boy003	<i>B. xerophyllus</i>	Boyacá	KP149266
Hxe_Cas001	<i>B. xerophyllus</i>	Casanare	KP149168
Hxe_Cas002	<i>B. xerophyllus</i>	Casanare	KP149111
Hpt_Cas001	<i>B. punctatus</i>	Casanare	KP149193
Hpt_Cas002	<i>B. punctatus</i>	Casanare	

Orrico et al. (2017)

Hla_Cas001	<i>B. lanciformis</i>	Casanare	KP149169
Hxe_Met001	<i>B. xerophyllus</i>	Meta	KP149265
Hxe_Met002	<i>B. xerophyllus</i>	Meta	KP149263
Hpt_Met001	<i>B. punctatus</i>	Meta	KP149186
Hpt_Met002	<i>B. punctatus</i>	Meta	KP149188
Hpt_Met003	<i>B. punctatus</i>	Meta	KP149258
Hpt_Met004	<i>B. punctatus</i>	Meta	KP149264
Hxe_Guy001	<i>B. xerophyllus</i>	Guyana	KX698011
Hxe_Guy002	<i>B. xerophyllus</i>	Guyana	KX697979
Hxe_Guy003	<i>B. xerophyllus</i>	Guyana	KX698024
Hxe_Guy004	<i>B. xerophyllus</i>	Guyana	KX698023
Hxe_Guy005	<i>B. xerophyllus</i>	Guyana	KX698008
Hci_Guy001	<i>B. cinerascens</i>	Guyana	KX698010
Hmu_Guy001	<i>B. multifasciatus</i>	Guyana	JN970761
Hmu_Guy002	<i>B. multifasciatus</i>	Guyana	JN970762
Hxe_Ror001	<i>B. xerophyllus</i>	Roraima	KX698024
Hxe_Ror002	<i>B. xerophyllus</i>	Roraima	KX698008
Hxe_Ror003	<i>B. xerophyllus</i>	Roraima	KX698023
Hcr_Bra001	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698022
Hcr_Bra002	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698006
Hcr_Bra003	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698017
Hcr_Bra004	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698015
Hcr_Bra005	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698000
Hcr_Bra006	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698018
Hcr_Bra008	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX697996
Hcr_Bra009	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX697997
Hcr_Bra010	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX697985
Hcr_Bra011	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX698013
Hcr_Bra013	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX697992
Hcr_Bra014	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX697988
Hcr_Bra016	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KX697995
Hcr_Bra017	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KU494468
Hcr_Bra018	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KU494470
Hcr_Bra019	<i>B. crepitans</i>	Brasil	KU494469
Hpa_Bra002	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KU494480
Hpa_Bra003	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KU494479
Hpa_Bra004	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KU494481
Hpa_Bra005	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KU494482
Hpa_Bra006	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KU494483
Hpa_Bra007	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697981
Hpa_Bra008	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697982
Hpa_Bra009	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697987
Hpa_Bra010	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697989
Hpa_Bra011	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697990
Hpa_Bra012	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697993
Hpa_Bra013	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX697994
Hpa_Bra014	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX698002
Hpa_Bra015	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX698005
Hpa_Bra016	<i>B. pardalis</i>	Brasil	KX698007
Hex_Bra002	<i>B. exastis</i>	Brasil	KX698019
Hlu_Bra001	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX698016
Hlu_Bra003	<i>B. lundii</i>	Brasil	KU494475
Hlu_Bra004	<i>B. lundii</i>	Brasil	KU494476
Hlu_Bra005	<i>B. lundii</i>	Brasil	KU494477
Hlu_Bra006	<i>B. lundii</i>	Brasil	KU494478
Hlu_Bra007	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX697983
Hlu_Bra008	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX697984

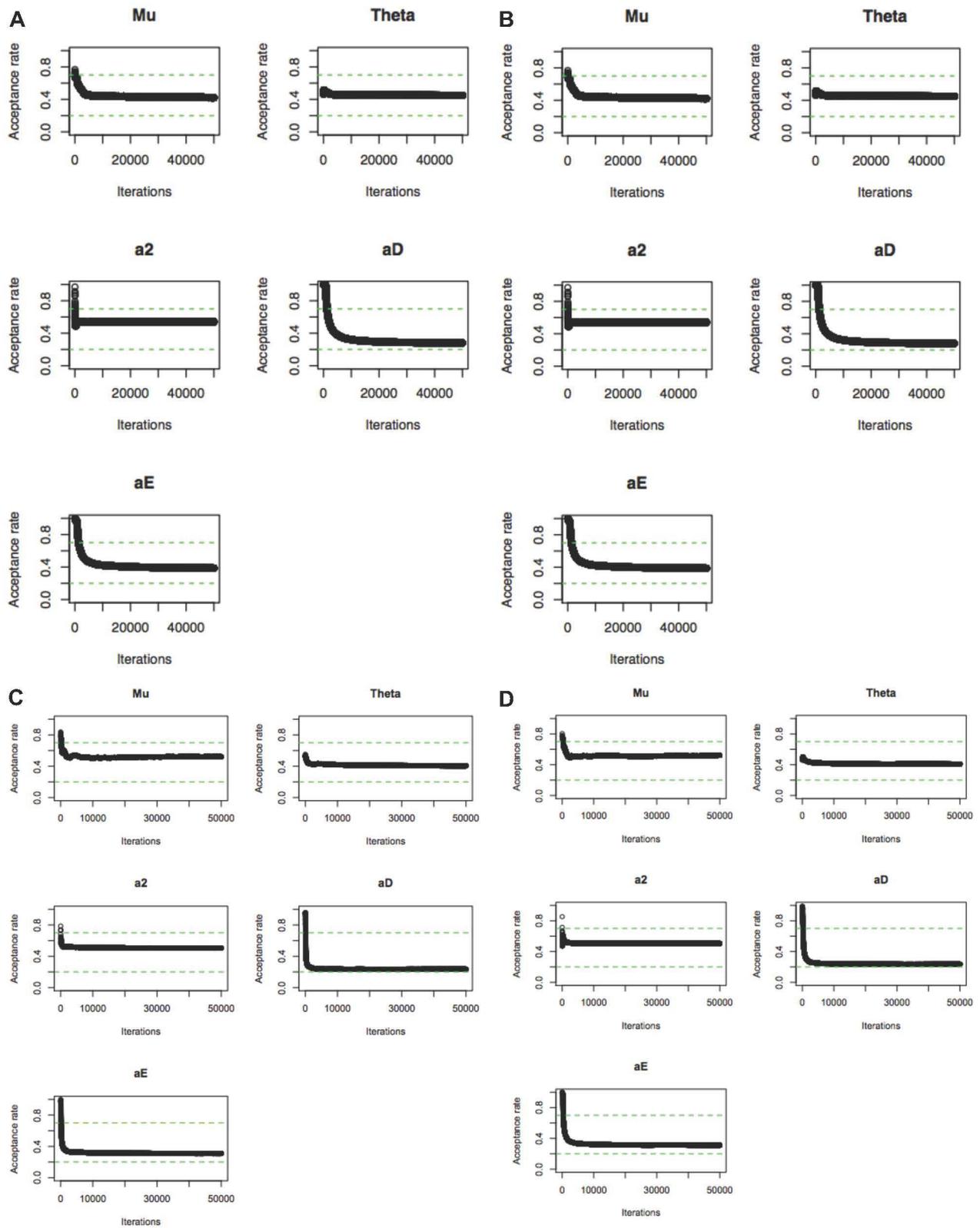
Hlu_Bra009	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX697991
Hlu_Bra010	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX697998
Hlu_Bra011	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX697999
Hlu_Bra012	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX698001
Hlu_Bra013	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX698003
Hlu_Bra014	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX698004
Hlu_Bra015	<i>B. lundii</i>	Brasil	KX698014
Hfa_Bra001	<i>B. faber</i>	Brasil	KX697980
Hfa_Bra002	<i>B. faber</i>	Brasil	KX698020
Her_Bra003	<i>B. ericae</i>	Brasil	KX698012
Hal_Bra001	<i>B. albomarginatus</i>	Brasil	KX698009
Hal_Bra002	<i>B. albomarginatus</i>	Brasil	KX698021
Hla_Ecu001	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970769
Hla_Ecu002	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970768
Hla_Ecu003	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970767
Hla_Ecu004	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970766
Hla_Ecu005	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970765
Hla_Ecu006	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970764
Hla_Ecu007	<i>B. lanciformis</i>	Ecuador	JN970763
Hpe_Ecu001	<i>B. pellucens</i>	Ecuador	JN970770
Hpe_Ecu002	<i>B. pellucens</i>	Ecuador	JN970771
Hru_Pan002	<i>B. rufitelus</i>	Panamá	FJ766740
Hru_Pan003	<i>B. rufitelus</i>	Panamá	FJ766739
Hpt_Arg001	<i>B. punctatus</i>	Argentina	KU184077

---

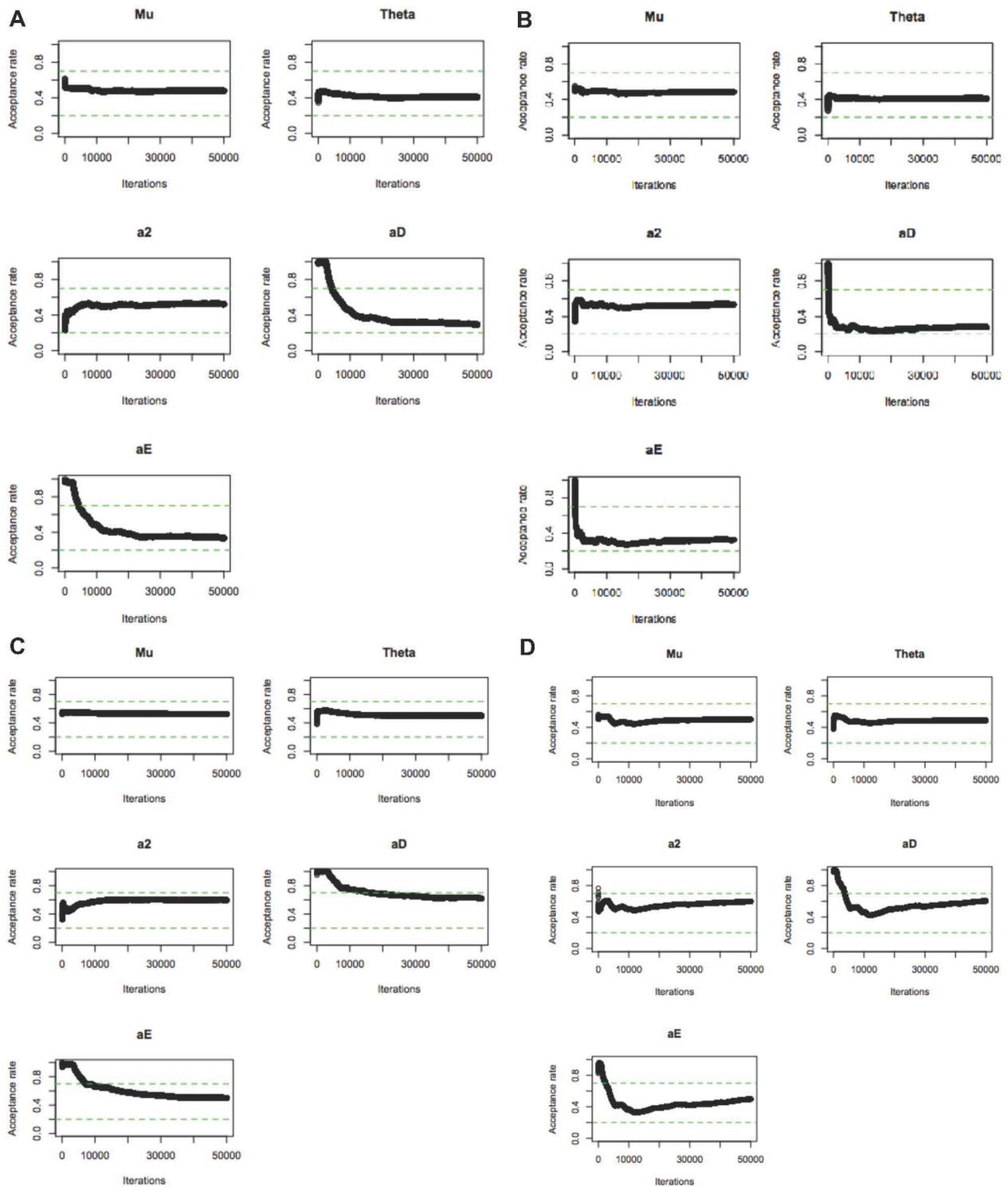
**Tabla S5.** Distancias genéticas estimadas con el gen COI (628pb) para las poblaciones de *B. xerophyllus* y *B. pugnax* en el Departamento del Tolima, Colombia. En rojo se indica la distancia genética promedio entre las poblaciones de estudio y las poblaciones de *B. xerophyllus* geográficamente más cercanas (Santander, Colombia).

1	0.0014	
2	0.0015	
3	0.0015	
4	0.0015	
5	0.0018	
6	0.0017	
7	0.0029	
8	0.0014	
9	0.0014	
10	0.0015	
11	0.0015	
12	0.0015	
13	0.0015	
14	0.0020	
15	0.0028	
16	0.0086	
17	0.0686	
18	0.1544	
19	0.1442	
20	0.1443	
21	0.1382	
22	0.2480	
23	0.2155	
24	0.2220	
25	0.1853	
26	0.2558	
27	0.2247	
28	0.2534	
29	0.2321	
30	0.2338	
31	0.2438	
32	0.2290	
33	0.2034	
34	0.2249	
35	0.2514	
36	0.2323	
37	0.2392	
38	0.1435	

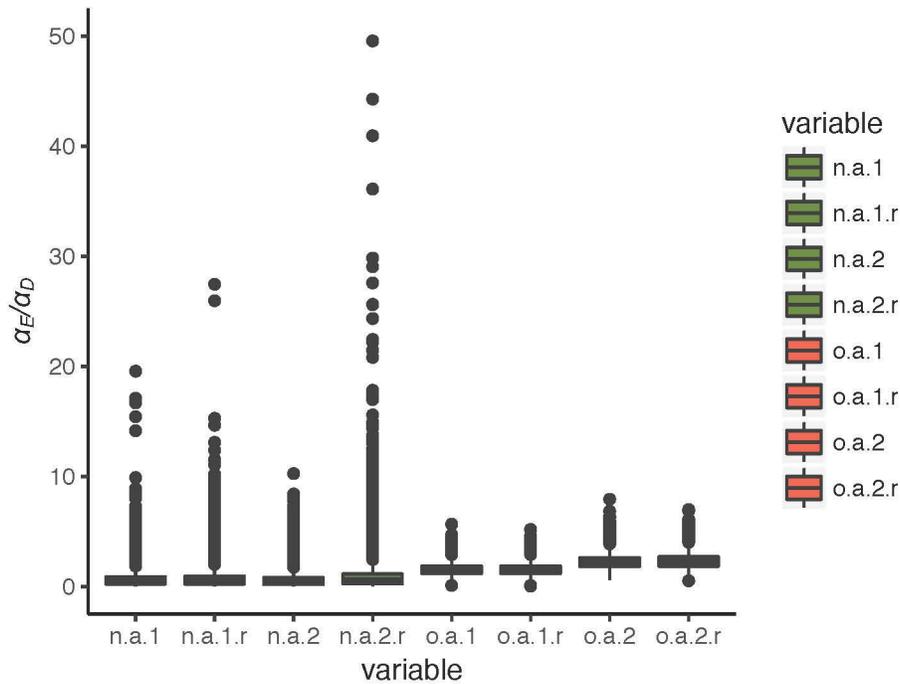
- 1 Armero *B. xerophyllus*
- 2 Venadillo *B. xerophyllus*
- 3 Chicoral *B. xerophyllus*
- 4 Picaleña *B. xerophyllus*
- 5 San Jorge *B. xerophyllus*
- 6 Orquídeas *B. xerophyllus*
- 7 Chaparral *B. xerophyllus*
- 8 Planadas *B. xerophyllus*
- 9 Carmen de Apicalá *B. xerophyllus*
- 10 Prado *B. xerophyllus*
- 11 Galilea *B. xerophyllus*
- 12 Santander *B. xerophyllus*
- 13 Meta *B. xerophyllus*
- 14 Casanare *B. xerophyllus*
- 15 Boyacá *B. xerophyllus*
- 16 Guyana *B. xerophyllus*
- 17 Roraima *B. xerophyllus*
- 18 Brasil *B. crepitans*
- 19 Purificación A *B. pugnax*
- 20 Purificación B *B. pugnax*
- 21 Armero *B. pugnax*
- 22 Brasil *B. pardalis*
- 23 Brasil *B. exastis*
- 24 Brasil *B. lundii*
- 25 Brasil *B. faber*
- 26 Meta *B. punctatus*
- 27 Casanare *B. punctatus*
- 28 Argentina *B. punctatus*
- 29 Guyana *B. cinerascens*
- 30 Ecuador *B. pellucens*
- 31 Panamá *B. rufitelus*
- 32 Brasil *B. ericae*
- 33 Brasil *B. albomarginatus*
- 34 Ecuador *B. lanciformis*
- 35 Guyana *B. multifasciatus*
- 36 *Dendropsophus microcephalus*
- 37 Casanare *B. lanciformis*
- 38 Santander *B. pugnax*



**Figura S3.** Tasas de aceptación y convergencia de la cadena Markoviana para 95 SNPs candidatos a selección con el modelo  $\beta$ -binomial en BEDASSLE para *B. xerophyllus*. A) Alelo 1, B) réplica del alelo 1, C) alelo 2 y D) réplica del alelo 2.



**Figura S4.** Tasas de aceptación y convergencia de la cadena Markoviana para 95 SNPs neutrales con el modelo  $\beta$ -binomial en BEDASSLE para *B. xerophyllus*. A) Alelo 1, B) réplica del alelo 1, C) alelo 2 y D) réplica del alelo 2. La gráfica de las contribuciones relativas de la distancia geográfica y la distancia ambiental se construyó después de eliminar el 50% de las cadenas como burnin (Fig. 22).



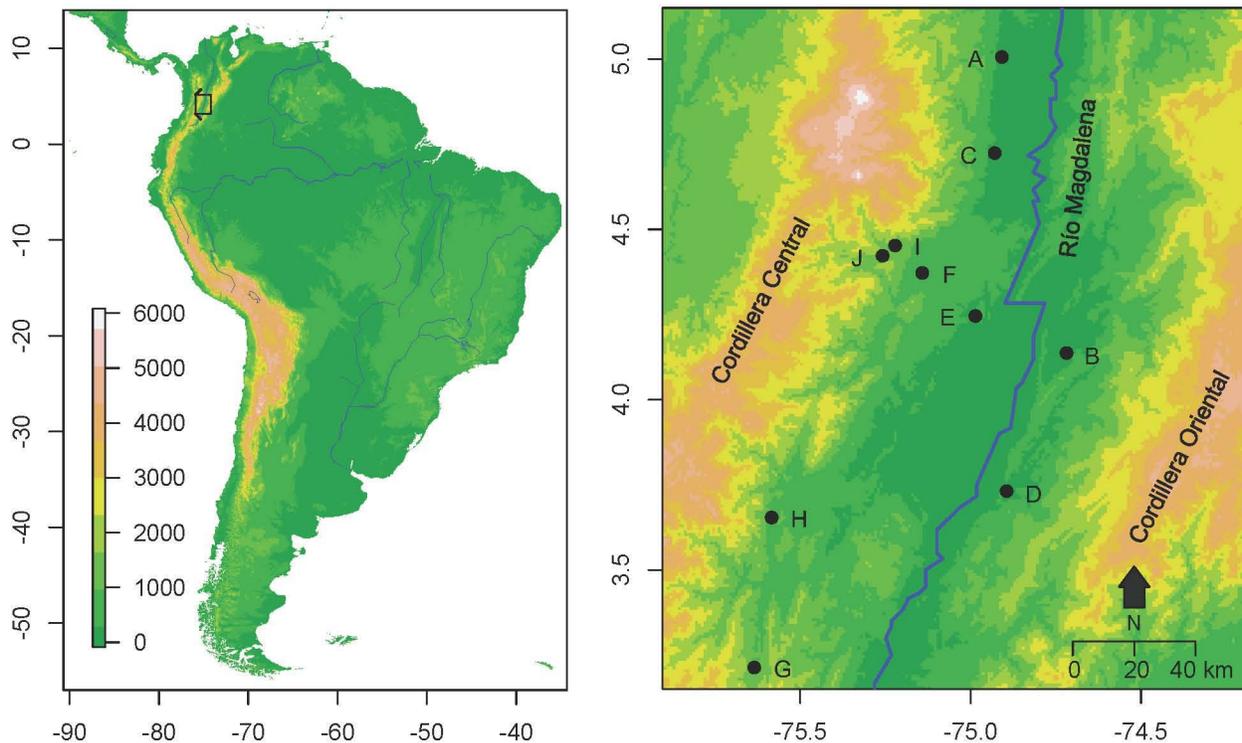
**Figura S5.** Diferencias en la distribución de los datos entre loci outliers y neutrales en *B. xerophyllus*. La gráfica muestra valores atípicos extremos para los loci neutrales (color verde), pero no para los outlier (color rojo). 1 y 2 indican alelo 1 y 2 respectivamente, y r la réplica de cada cadena.

**Tabla S6.** Medidas de diferenciación genética pareada ( $F_{st}$ ) de diez poblaciones de *Boana xerophyllus* con 95 SNPs outlier utilizados para el análisis de aislamiento por ambiente con BEDASSLE. Los valores en color gris indican los índices de fijación más altos entre poblaciones. La significancia fue  $P=0.83$  y se estimó con 1000 permutaciones en la función test.g del paquete Hierfstat v0.4.22 (Goudet 2005), de igual forma la diferenciación pareada se estimó con la función genet.dist con el método WC84 del mismo paquete.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
B	0.204								
C	0.150	0.278							
D	0.388	0.235	0.305						
E	0.336	0.390	0.260	0.409					
F	0.367	0.350	0.087	0.420	0.307				
G	0.467	0.378	0.011	0.334	0.447	0.141			
H	0.440	0.333	0.090	0.327	0.37	0.218	0.095		
I	0.415	0.419	0.168	0.427	0.314	0.141	0.208	0.226	
J	0.520	0.516	0.317	0.526	0.426	0.221	0.306	0.320	0.117

**Tabla S7.** Medidas de diferenciación genética pareada ( $F_{st}$ ) de diez poblaciones de *Boana xerophyllus* con 95 SNPs outlier utilizados para el análisis de aislamiento por ambiente con BEDASSLE. Los valores en color gris indican los índices de fijación más altos. La significancia fue  $P=1$  y se estimó con 1000 permutaciones en la función test.g del paquete Hierfstat v0.4.22 (Goudet 2005), de igual forma la diferenciación pareada se estimó con la función pairwise.fst del mismo paquete.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
B	0.091								
C	0.079	0.082							
D	0.063	0.074	0.039						
E	0.091	0.100	0.114	0.14					
F	0.074	0.020	0.020	0.070	0.080				
G	0.069	0.085	0.000	0.045	0.080	0.078			
H	0.185	0.072	0.157	0.138	0.178	0.046	0.070		
I	0.078	0.074	0.065	0.096	0.061	0.016	0.021	0.093	
J	0.112	0.082	0.084	0.113	0.102	0.042	0.059	0.110	0.027



**Figura S6.** Distribución espacial de los diez sitios de muestreo utilizados para la medida de diferenciación poblacional ( $F_{st}$ ) debido a la estructura genética.