Inferencia filogenética del género *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) mediante el uso de los programas MEGA y BEAST2

Phylogenetic inference of the genus *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) using the MEGA and BEAST2 programs

Irvin N. Gómez ¹

¹ Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Bocas del Toro, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Panamá. irving.gomez-t@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0001-8907-373X>

Recibido: 22 de mayo de 2025

Aceptado: 29 de julio de 2025

DOI <https://doi.org/10.48204/j.colonciencias.v12n2.a8005>

Resumen

El género *Pristimantis* es muy diverso en los bosques tropicales de Centroamérica presentando una amplia variedad morfológica lo cual hace muy difícil su clasificación, por lo que en la actualidad se requieren de técnicas moleculares que ayuden a comprender la relación genética del género. El siguiente estudio estableció un análisis de inferencia bayesiana para comprender los procesos de modelado de especiación del género *Pristimantis* entre Costa Rica, Panamá y Colombia, para lo cual se utilizaron los programas MEGA, BEAST2 y FigTree utilizando genes COI del GenBank del NCBI, para estudiar las relaciones evolutivas entre poblaciones del género *Pristimantis*. Como resultado, se obtuvieron valores de Bootstrap altamente significativos en los nodos de algunas especies (> 90 %), lo que confirma la fiabilidad de las relaciones evolutivas obtenidas y una posible especiación pasada o en curso. La inferencia bayesiana demostró que las especies *P. cruentus* (Copé, Coclé), *P. cerasinus* (Valle de Antón, Coclé) y *P. museosus* (Santa Fe, Veraguas y Copé, Coclé) presentaron clados con agrupaciones muy cercanas y con ramas más cortas, lo que evidencia indicios de una especiación más reciente en este grupo. Además, la población de *P. museosus* en Limón, Costa Rica, presenta una mayor divergencia genética respecto a las poblaciones centrales

de Panamá, muy probablemente por el aislamiento de la cordillera de Talamanca. De igual forma, las poblaciones de *P. gaigei* en Antioquia y Panamá revelan clados distintos con considerable divergencia genética, posiblemente debido a separación por barreras geográficas importantes como la Cordillera de los Andes y el propio Istmo de Panamá.

Palabras clave: Cladograma; especiación; gen COI; inferencia bayesiana; máxima verosimilitud.

Abstract

The genus *Pristimantis* is highly diverse in the tropical forests of Central America, presenting a wide morphological variety, which makes its classification very difficult. Therefore, molecular techniques are currently required to aid in understanding the genetic relationship of the genus. The following study attempts established a Bayesian inference analysis to understand the speciation modeling processes of the genus *Pristimantis* between Costa Rica, Panama, and Colombia. For this purpose, the programs MEGA, BEAST2, and FigTree were used using COI genes from the NCBI GenBank to study the evolutionary relationships between populations of the genus *Pristimantis*. As a result, highly significant Bootstrap values were obtained at the nodes of some species (>90%), confirming the reliability of the evolutionary relationships obtained and a possible past or ongoing speciation. Bayesian inference showed that the species *P. cruentus* (Copé, Coclé), *P. cerasinus* (Valle de Antón, Coclé), and *P. museosus* (Santa Fe, Veraguas, and Copé, Coclé) presented clades with very close groupings and shorter branches, which shows signs of a more recent speciation in this group. Furthermore, the population of *P. museosus* in Limón, Costa Rica, presents greater genetic divergence with respect to the central populations of Panama, most likely due to the isolation of the Talamanca Mountain range. Similarly, the populations of *P. gaigei* in Antioquia and Panama reveal distinct clades with considerable genetic divergence, possibly due to separation by important geographical barriers such as the Andes Mountains and the Isthmus of Panama itself.

Keywords: Cladogram; speciation; COI gene; Bayesian inference; maximum likelihood.

Introducción

El género *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) es muy diverso en América Latina, contando con más de 500 especies identificadas y a la vez, distribuidas desde el sur de México hasta la región norte de Argentina, con especial presencia común entre los bosques tropicales de Panamá y Costa Rica (Reyes-Puig et al., 2020) donde presenta una amplia variedad morfológica lo cual hace muy difícil su clasificación, por lo que en la actualidad se requieren de técnicas moleculares que ayuden a comprender la relación genética del género (Venegas, 2021).

Estudios recientes han encontrado grandes diferencias en los genes de las ranas del género *Pristimantis* que habitan en Limón en Costa Rica, Bocas del Toro y Coclé en Panamá. En particular, los estudios sobre *Pristimantis museosus*, la cual es endémica de las cordilleras centrales de Panamá, han demostrado una distancia genética del 7,1 % en el estudio del gen Citocromo Oxidasa I (COI), lo que indica posibles eventos de especiación en la región (Arias et al., 2025; Acosta-Chaves et al., 2019). En este sentido, este tipo de información nos ayuda a entender el nivel de emparentamiento del género en Mesoamérica.

El Istmo de Panamá emergió hace aproximadamente tres millones de años y desde entonces ha sido clave para en diversificación y distribución espacial de los diferentes tipos de ranas incluido el género *Pristimantis*. Es probable que su papel de barrera geográfica haya presionado la especiación de múltiples linajes de anfibios, como bien lo explican Montes et al. (2015). Así mismo, De Oliveira et al. (2019) sugieren que las grandes modificaciones ocurridas en el medio ambiente durante el Neógeno y el Cuaternario de la era Cenozoica, tienen que haber afectado la distribución de especies, pero más importante, sus relaciones filogenéticas. Es posible que el género de las llamadas ranas de lluvia, en Panamá, haya evolucionado de manera diferente debido a los cambios en el clima y los accidentes geográficos (Acevedo et al., 2020).

Para esclarecer las relaciones evolutivas entre las poblaciones de un género de anfibios distribuidos en una región, es fundamental la utilización de herramientas como GenBank y el programa filogenético MEGA, que permiten el análisis molecular que compara las secuencias del ADN mitocondrial, a través del uso de marcadores citocromo oxidasa (COI), los cuales, según

Reyes-Puig et al. (2020) han sido muy utilizados para revelar de manera gráfica las similitudes y diferencias genéticas dentro de grupos taxonómicos estrechamente relacionados, mediante la reconstrucción de árboles filogenéticos, pudiendo inferir su relación, según los patrones de emparentamiento de las poblaciones del género *Pristimantis* distribuidas en Costa Rica y Panamá.

Esta investigación tiene como objetivo un análisis de inferencia bayesiana para comprender los procesos de especiación del género *Pristimantis* entre Costa Rica, Panamá y Colombia, a través de la construcción de cladogramas que permitan entender los procesos que pueden estar modelando la biodiversidad del género en Centroamérica, como posibles efectos de una especiación.

Metodología

Para esta investigación se seleccionaron las especies: *Pristimantis cruentus*, *Pristimantis cerasinus* y *Pristimantis museosus*, las cuales habitan en las regiones de Costa Rica en el Cantón Limón a una altitud de 60 m.s.n.m., presentando clima cálido y lluvioso durante todo el año y su temperatura promedio alcanza los 24.6 °C y precipitaciones anuales de 3,226 mm, en un clima de tipo Af según Köppen (Adaptation Fund, 2023). La especie *Pristimantis ridens*, habita en el Cantón de Puntarenas a una altitud de 200 m.s.n.m., con clima cálido y húmedo, con una marcada estación lluviosa y seca, donde la temperatura promedio anual es de 27.0 °C, con precipitaciones anuales que alcanzan aproximadamente los 2,600 mm. Según la clasificación climática de Köppen, el clima predominante es del tipo Aw (sabana tropical con estación seca) (Adaptation Fund, 2023) (Figura 1).

En Panamá la especie *Pristimantis gagei* habita en el Valle de Riscó en la provincia de Bocas del Toro, en el bosque húmedo tropical a una altitud de 118 m.s.n.m., con temperatura promedio anual de 30 °C, la humedad promedio anual de 76 % y precipitación promedio anual de 2,000 mm (MiAmbiente, 2024).

Figura 1

Localizaciones del género *Pristimantis* en Costa Rica, Panamá y Colombia

Fuente: QGIS 3.26.3

En la provincia de Coclé, las especies estudiadas: *Pristimantis cruentus*, *Pristimantis ridens*, *Pristimantis cerasinus*, *Pristimantis museosus* y *Pristimantis gaigei*, habitan el bosque tropical, entre los 900 a 1000 m.s.n.m., lo cual produce variaciones en cuanto a la precipitación, alcanzando los 2,000 m.s.n.m., estableciendo una zona más fresca con marcada estacionalidad para las precipitaciones (UNEP, 2025). En Colombia, en el departamento de Antioquia, las especies *Pristimantis gaigei* y *Pristimantis museosus* habitan entre los 800 y 900 m.s.n.m. en el bosque tropical donde el clima es húmedo, con temperaturas de 21°C a 31°C durante todo el año y las precipitaciones pueden oscilar entre 1500 y 4000 mm, reuniendo condiciones muy similares a las

de Cana en Darién, por ser esta la zona fronteriza entre Panamá y Colombia (Posada et al., 2008) (Figura 1, Tabla 1).

Tabla 1

Localidad de los anfibios, locus y tamaño del gen COI dentro del GenBank (NCBI)

Sitio	Georreferenciación		Especie	GenBank	Tamaño (pb)
Costa Rica (Limón)	10°12'00.0"N	83°45'00.0"W	<i>Pristimantis cruentus</i>	JN991368.1	612
Costa Rica (Limón)	10°02'24.0"N	83°33'00.0"W	<i>Pristimantis cerasinus</i>	JN991366.1	600
Costa Rica (Puntarenas)	8°44'24.0"N	82°57'36.0"W	<i>Pristimantis ridens</i>	JN991400.1	552
Costa Rica (Limón)	9°25'51.6"N	82°58'40.8"W	<i>Pristimantis museosus</i>	PQ610213.1	622
Panamá (Valle Riscó)	9°08'02.4"N	82°29'49.2"W	<i>Pristimantis gaigei</i>	JN991377.1	612
Panamá (Valle de Antón)	8°40'12.0"N	80°35'24.5"W	<i>Pristimantis cerasinus</i>	FJ766786.1	648
Panamá (PN Coclé)	8°40'12.0"N	80°35'25.0"W	<i>Pristimantis ridens</i>	FJ766806.1	648
Panamá (PNOT Copé)	8°40'12.0"N	80°35'24.0"W	<i>Pristimantis cruentus</i>	FJ766787.1	648
Panamá (PN Coclé)	8°40'12.0"N	80°35'24.0"W	<i>Pristimantis gaigei</i>	FJ766792.1	648
Panamá (PNOT Copé)	8°40'01.2"N	80°35'31.2"W	<i>Pristimantis museosus</i>	KC129265.1	645
Panamá (V Santa Fé)	8°40'01.2"N	80°35'31.2"W	<i>Pristimantis museosus</i>	KC129264.1	645
Panamá (Darién, Cana)	7°45'44.0"N	77°43'26.8"W	<i>Pristimantis museosus</i>	KC014731.1	658
Colombia (Antioquia)	6°49'12.0"N	75°08'52.8"W	<i>Pristimantis gaigei</i>	JN991378.2	553

Para establecer la filogenia de *Pristimantis* entre los puntos de Costa Rica, Panamá y Colombia, se hizo uso de la información que provee el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y se obtuvieron las secuencias del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI), el cual es un marcador mitocondrial ampliamente utilizado en estudios filogenéticos de delimitación de especies, debido a que presenta una alta confiabilidad para diferenciar linajes evolutivos muy cercanos (Kumar y Sujeesha, 2025; Nazari et al., 2024). Para la realización de esta parte se consideraron los siguientes factores: cada secuencia del gen COI para cada anfibio debía tener una longitud mínima de 550 pb para que tuviese suficiente información; eliminación de nucleótidos ambiguos y la selección de aquellos individuos que habitaran en Costa Rica, Panamá y Colombia.

Luego de obtener las secuencias, se alinearon utilizando el método ClustalW mediante el programa MEGA, siguiendo la metodología de Kumar et al. (2024), esto asegura mayor precisión, delección de posiciones ambiguas. En cuanto a la construcción del árbol filogenético se emplearon dos metodologías para la inferencia que incluyeron: la máxima verosimilitud (ML) y la inferencia bayesiana (BI).

Para la máxima verosimilitud (ML) con el programa MEGA se proporcionó un enfoque robusto para evaluar las relaciones evolutivas entre las especies de anfibios (Kumar et al., 2024). Se seleccionó el modelo evolutivo Tamura Nei (TN93), debido a que toma en cuenta la posibilidad de que un sitio genético pudo haber sido mutado más de una vez en una línea evolutiva, lo que puede dificultar la estimación precisa de las distancias evolutivas y por último se realizaron pruebas Bootstrap con 1000 repeticiones para evaluar la solidez de los nodos.

En el caso de la inferencia bayesiana (BI), se realizaron análisis en Mr.Bayes utilizando un millón de generaciones y una tasa de muestreo de cada 1000 generaciones, siguiendo la metodología de Smith et al. (2024) y se procedió con la aplicación de un porcentaje de descarte de 25%, para evitar de esta forma sesgos en la convergencia de datos y por último se analizó la probabilidad para determinar la confiabilidad de los nodos en los árboles filogenéticos obtenidos.

Para la validación de los árboles presentados por ML y BI se utilizó un análisis de distancia con el modelo de Kimura 2 Parameter (K2P) con el programa MEGA por su fiabilidad como estándar en estudios de códigos de barras genéticos (Argôlo et al., 2025) para luego contrastarse con estudios previos sobre *Pristimantis* en Centroamérica y de esta manera poder discutir con coherencia sobre los resultados obtenidos en otras investigaciones filogenéticas.

Resultados

Análisis filogenético basado en la máxima verosimilitud

El análisis filogenético se realizó basado en la máxima verosimilitud (ML) con la ayuda del programa **MEGA** el cual permitió establecer las relaciones evolutivas entre distintas poblaciones del género *Pristimantis* de *Costa Rica hasta Colombia*, con la estructuración de un cladograma. De esta manera se obtuvo la presencia de valores de Bootstrap, altamente significativos ($> 90\%$) en varios nodos, respaldando la confiabilidad de los clados principales dentro de este estudio (Figura 2).

Figura 2

Análisis evolutivo con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Kimura 2 Parameter (K2P)

Fuente: MEGA 12.0.11

Análisis de inferencia bayesiana

Con el uso del programa BEAST2 se generó un árbol filogenético que reveló distintos patrones de especiación de las ranas del género *Pristimantis* de Costa Rica, Panamá y Colombia. Las secuencias de los genes COI determinaron que uno de los clados más antiguos observados incluyeron a *P. museosus* (Cana, región fronteriza de Darién) y *P. museosus* (Limón, Costa Rica), junto a *P. gaigei* (Antioquia, Colombia) y *P. ridens* (Puntarenas, Costa Rica), que demuestran un soporte bayesiano considerable, lo que indica una divergencia temprana en la historia evolutiva del grupo (Figura 3).

Figura 3

Análisis de inferencia bayesiana del género Pristimantis mediante el programa Beast 2 y FigTree

Fuente: Beast 2.7.7

Discusión

Las relaciones evolutivas entre distintas poblaciones del género *Pristimantis* de Costa Rica hasta Colombia, establecieron la estructuración de un cladograma bien soportado. En este sentido, el árbol filogenético generado mediante el modelo Kimura 2 Parameter (K2P) demostró como distintas especies de *Pristimantis*, sobre todo aquellas distribuidas entre Panamá y Costa Rica, presentaron buenos valores de soporte Bootstrap ($\geq 99\%$) en cada nodo, para la escala evolutiva de 0.050, sugiriendo una fuerte evidencia de relaciones filogenéticas dentro del grupo analizado (Figura 1).

Sin embargo, es apreciable que el nodo menos significativo (39 %) correspondiente a *Pristimantis museosus* entre las poblaciones de Copé y Limón, suceda a causa de varios factores, entre ellos, la variabilidad genética intraespecífica o a causa de eventos de hibridación que afectan de alguna forma la resolución filogenética de estas especies.

Esto se contrasta con el hecho que *Pristimantis museosus* ha demostrado una alta diversidad genética en estudios similares, lo que crea un grado de incertidumbre en las posiciones de individuos dentro del árbol filogenético (Crawford et al., 2010), sin descartar aquellas teorías que sugieren que los haplotipos divergentes dentro de la misma población pueden reducir la confiabilidad en la inferencia filogenética.

Es notable la cercanía geográfica entre Copé y Limón, posibilitando un aparente flujo génico entre poblaciones, lo que puede estar además creando señales filogenéticas ambiguas al sugerir que podría causar una tendencia de las especies más relacionadas a parecerse más entre sí que las especies extraídas al azar del mismo árbol, lo cual añade la necesidad de profundizar en otros objetivos de investigación para entender mejor este punto. Por otro lado, también se debe considerar que los cambios en la estructura genética de algunas poblaciones, específicamente en estas áreas, pueden estar causados por enfermedades como la quitridiomycosis, que ha sido reportada en estos países, influyendo en la estabilidad de los nodos filogenéticos (Crawford et al., 2010).

El agrupamiento observado en *Pristimantis ridens* y *Pristimantis cerasinus* indica una cercanía evolutiva interespecífica, lo que concuerda con estudios moleculares previos que sugieren una divergencia reciente, tal vez como resultado de aislamiento reproductivo o de la selección natural que opera como un proceso evolutivo fundamental que conlleva a la especiación. Por último, el alto soporte reflejado en las poblaciones de *Pristimantis gaigei* refuerza la hipótesis de diferenciación notable entre poblaciones geográficas que se esfuerzan por un tipo de especiación que puede estar influida por adaptaciones a la supervivencia como lo indican Gutiérrez-Pineda et al. (2020) y como se observa entre las poblaciones de Panamá y Colombia (Figura 2).

Estos resultados incorporan información adicional para estudios de biodiversidad y conservación, debido a que la separación filogenética entre poblaciones de anfibios, lo que sugiere posibles adaptaciones ecológicas específicas a sus respectivos hábitats.

Con el uso del programa BEAST2 se pudo demostrar que las secuencias de los genes COI determinaron que uno de los clados más antiguos observados incluyeron a *P. museosus* (Cana, región fronteriza de Darién) y *P. museosus* (Limón, Costa Rica), junto a *P. gaigei* (Antioquia, Colombia) y *P. ridens* (Puntarenas, Costa Rica) demuestran un soporte bayesiano considerable que indica una divergencia temprana en la historia evolutiva del grupo. Es probable que un acontecimiento de este tipo, este relacionado al aislamiento geográfico que generó el Istmo de Panamá, el cual actúa como una barrera al flujo de genes entre las poblaciones de los anfibios de los países Centroamericanos, como lo explica Fouquet et al. (2022).

No obstante, las especies *P. cruentus* (Copé, Coclé), *P. cerasinus* (Valle de Antón, Coclé) y *P. museosus* (Santa Fe, Veraguas y Copé, Coclé) presentaron clados con agrupaciones muy cercanas y con ramas más cortas, lo que evidencia indicios de una especiación más reciente en este grupo. A su vez, estos resultados de alguna forma podrían asociarse a procesos ecológicos propios de los anfibios, que son manifestados por la expansión de los nichos o por el efecto limitante del aislamiento por la dependencia de microhábitats en regiones montañosas. En este mismo sentido, el vínculo específico entre *P. ridens* (Valle de Antón, Coclé) y *P. gaigei* (Copé, Coclé) parece generar una relación dependiente, lo que implica el mantenimiento de un flujo genético entre estos

grupos en la actualidad o que fueron parte de una divergencia a partir de un ancestro común por distanciamiento geográfico (Lips et al., 2006).

En una investigación realizada por Arias *et al.* (2025) en la cordillera de Talamanca entre Costa Rica y Panamá, se reportó la existencia de dos subclados en las poblaciones de *Pristimantis museosus*, aisladas por distancias genéticas de 7.1 % en el gen citocromo oxidasa I (COI), lo que genera una indiscutible diferenciación entre especies cercanas. Esto coincide con los resultados obtenidos según el mejor patrón de inferencia predictiva entre las poblaciones de *P. museosus* en Santa Fe y Copé, las cuales, muestran una mayor similitud genética entre ellas, tal vez, por mantener una conectividad bien estable a lo largo del tiempo, dentro de los hábitats más adecuados en esta región (Figura 3).

Por otro lado, la población de *P. museosus* en Limón, Costa Rica, presenta una mayor divergencia genética respecto a las poblaciones centrales de Panamá, muy probablemente por la Cordillera de Talamanca y la variabilidad climática, condición que cambia para la población de *P. museosus* (Cana, Darién) del este de Panamá, con la que concuerda mejor morfológica y filogenéticamente (Arias et al., 2025).

Por último, el análisis de inferencia bayesiana para las poblaciones de *P. gaigei* en Antioquia y Panamá revelaron clados distintos con considerable divergencia genética. Lo más probable, es que sea debido a la separación por barreras geográficas importantes como la Cordillera de los Andes, el propio Istmo de Panamá y sus cadenas montañosas.

Esto concuerda con la variación de los caracteres morfológicos de la especie *P. gaigei* de Antioquia que tiene largas extremidades, para una mejor movilidad en las montañas, mientras que las poblaciones de Panamá presentan morfotipos más compactos, para la adaptación a microhábitats con humedales donde tienden a ser menos dinámicos (Fouquet et al., 2022).

Conclusiones

El análisis filogenético que se llevó a cabo usando MEGA y BEAST2, produjo patrones evolutivos dentro del género *Pristimantis* en Costa Rica, Panamá y Colombia. Los resultados muestran que en poblaciones que se encuentran geográficamente distantes, las diferencias genéticas son notorias, lo cual sugiere que ha habido eventos de especiación tanto recientes como en el pasado. En especial, en el estudio del gen COI se logró observar una gran divergencia en *Pristimantis museosus*, lo que comprueba los resultados de un estudio en Costa Rica con esta misma rana, donde el valor de cambio en el gen COI fue de 7.1% de separación con otras poblaciones de *Pristimantis museosus* de Costa Rica con las poblaciones del este y oeste de Panamá, por lo tanto, se puede decir que estas poblaciones están en estos momentos enmascarando linajes crípticos dentro de las especies reconocidas actualmente.

Los grupos formados por especies como *P. ridens* y *P. cerasinus* presentaron valores altos de Bootstrap respaldando la robustez del árbol filogenético, lo que corrobora una posible hipótesis de una divergencia más reciente. Mientras que *P. gaigei* demostró una diferenciación apreciable entre sus poblaciones, lo cual concuerda con la línea sobre estudios previos de evolución dentro de la especie del género. Sin embargo, este trabajo contempla solo conocer la relación filogenética de las especies del género *Pristimantis* encontradas en Panamá, Costa Rica y Colombia, destacando la necesidad de usar enfoques filogenéticos más profundos e incluir a otros anfibios de la familia Craugastoridae para comprender mejor las relaciones filogenéticas dentro del grupo a partir de eventos de especiación.

En cuanto a la conservación, resultados filogenéticos del cladograma obtenido en este estudio sirven para entender la aparente formación de linajes crípticos entre las poblaciones de *Pristimantis* y su alta variabilidad genética. La integración de herramientas moleculares como GenBank, el programas de inferencia filogenética como MEGA y de inferencias bayesianas como BEAST2 proporcionaron un marco sólido relacionando las especies y permitiendo un conocimiento base para futuras investigaciones en ecología evolutiva. Finalmente, para poder comprender los cambios de los linajes crípticos de los anfibios es necesario complementar las

investigaciones de sistemática molecular con otros datos de morfología y aspectos reproductivos y ecológicos que permitan entender como divergen los grupos estudiados. De esta manera, se podría conseguir mejorar el conocimiento del estado taxonómico de las especies de anfibios que como *Pristimantis* han demostrado ciertos grados de especiación en Centroamérica.

Conflicto de interés

El autor declara que no existe conflicto de interés en la redacción de este artículo.

Referencias Bibliográficas

- Acevedo, A. A., Armesto, O., & Palma, R. E. (2020). Two new species of *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) with notes on the distribution of the genus in northeastern Colombia. *Zootaxa*, 4750(4), 499-523. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4750.4.3>
- Acosta-Chaves, V. J., Madrigal-Elizondo, V., Chaves, G., Morera-Chacón, B., García-Rodríguez, A., & Bolaños, F. (2019). Shifts in the diversity of an amphibian community from a premontane forest of San Ramón, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 67(2), 259-273. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i2supl.37240>
- Adaptation Fund. (2023). Enhancing the climate resilience of coastal communities in Limón, Costa Rica, and Bocas del Toro, Panamá through nature-based solutions for local livelihoods. *Adaptation Fund Reports*. <https://www.adaptation-fund.org/project/enhancing-the-climate-resilience-of-coastal-communities-in-limon-costa-rica-and-bocas-del-toro-panama-through-nature-based-solutions-for-local-livelihoods-costa-rica-panama/>
- Argôlo, L. A., Ramos, R. T. C., Bitencourt, J. A., Galdino, J. H., Sampaio, I., & Affonso, P. R. A. M. (2025). Hidden diversity revealed by DNA barcoding of Paralichthyidae fish along the

Caribbean and Brazilian coast. *Genetica*, 153(4). <https://doi.org/10.1007/s10709-024-00221-4>

Arias, E., Salazar, S., y Vásquez, A. P. (2025). Primer registro de la rana de lluvia, *Pristimantis museosus* (Ibáñez, Jaramillo y Arosemena, 1994), en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 8(1), e1103-100. <https://herpetologia.fcienencias.unam.mx/index.php/revista/article/view/1103>

Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 13777-13782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914115110>

De Oliveira Miranda, N. E., Maciel, N. M., Lima-Ribeiro, M. S., Colli, G. R., Haddad, C. F. B., & Collevatti, R. G. (2019). Diversification of the widespread neotropical frog *Physalaemus cuvieri* in response to Neogene-Quaternary geological events and climate dynamics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 132, 67-80. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.11.003>

Elizondo, L. (2013). Descripción preliminar de la composición herpetofaunística en localidades panameñas impactadas por quitridimicosis. *Tecnociencia*, 19(2), 5-12. <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/118>

Fouquet, A., Réjaud, A., Rodrigues, M. T., Ron, S. R., Chaparro, J. C., Osorno, M., & Chave, J. (2022). Diversification of the *Pristimantis conspicillatus* group (Anura: Craugastoridae) within distinct neotropical areas throughout the Neogene. *Systematics and Biodiversity*, 20(1), 1-16. <https://doi.org/10.1080/14772000.2022.2130464>

Gutiérrez-Pineda, K. M., Morales, R., & Batista, A. (2020). Descubrimiento de alcaloides en la piel de la rana *Pristimantis gagei*, indicios de mimetismo Müllleriano en dos poblaciones

de Panamá. *Mesoamericana*, 24(1), 49-57.

<https://doi.org/10.48204/j.mesoamericana.v24n1a7>

Kumar, P., & Sujeesha, P. (2025). Molecular characterization of *Channa* species based on cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 12(1), 16-20. <https://www.faunajournal.com/archives/2025.v12.i1.A.1069/molecular-characterization-of-channa-species-based-on-cytochrome-c-oxidase-subunit-i-coi-gene>

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12). <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>

Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., & Collins, J. P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3165-3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.050688910>

Ministerio de Ambiente (MiAmbiente) (2024). Exponen proyecto de resiliencia climática en Bocas del Toro. *Dirección de Cambio Climático - MiAmbiente Panamá*. <https://dcc.miambiente.gob.pa/exponen-proyecto-de-resiliencia-climatica-en-bocas-del-toro/>

Montes, C., Cardona, A., Jaramillo, C., Pardo, A., Silva, J. C., Valencia, V., & Niño, H. (2015). Middle Miocene closure of the Central American seaway. *Science*, 348(6231), 226-229. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaa2815>

Nazari, V., Lukhtanov, V., Naderi, A., Della Bruna, C., Zahiri, R., Cesaroni, D., Sbordonni, V., & Todisco, V. (2024). COI Barcodes combined with multilocus data for representative *Aporia* taxa shed light on speciation in the high altitude Irano-Turanian mountain plateaus. *BMC Ecology and Evolution*, 24, 105. <https://doi.org/10.1186/s12862-024-02294-3>

- Posada, C. C., Bravo, D. H., Arango, I. D. C., Arbaux, M. H., Rivera, O. M., y Gómez, R. L. (2008). Cambio climático ¿una caja de pandora? Corantioquia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34584>
- Reyes-Puig, C., Yáñez-Muñoz, M. H., Ortega, J. A., y Ron, S. R. (2020). Relaciones filogenéticas del subgénero *Hypodictyon* (Anura: Strabomantidae: Pristimantis) con la descripción de tres especies nuevas de la región del Chocó. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91. doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3013
- Smith, K., Ayres, D., Neumaier, R., Wörheide, G., & Höhna, S. (2024). Bayesian Phylogenetic Analysis on Multi-Core Compute Architectures: Implementation and Evaluation of BEAGLE in RevBayes With MPI. *Systematic Biology*, 73(2), 455–469. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syae005>
- UNEP. (2025). Climate change adaptation measures in Central America: The case of Costa Rica and Panamá. *United Nations Environment Programme Reports*. https://www.adaptation-fund.org/wp-content/uploads/2021/08/UNEP_Costa-Rica-Panama.pdf
- Venegas Valencia, K. (2021). Diversidad críptica en los Andes: clarificando la riqueza genética, variabilidad acústica y morfológica de *Pristimantis paisa* (Anura: Craugastoridae). <http://hdl.handle.net/10495/22440>