



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN ECOSISTEMAS

**POSICIÓN FILOGENÉTICA Y DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA
ESPECIE DE *PRISTIMANTIS* (ANURA: STRABOMANTIDAE) DE
LA RESERVA BIOLÓGICA COLONSO CHALUPAS, NAPO,
ECUADOR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN ECOSISTEMAS

AUTOR: KEYKO DANIELA LOZA CARVAJAL

TUTOR: Ph.D. HUGO MAURICIO ORTEGA ANDRADE

CO-TUTOR: M.SC. MARIO HUMBERTO YANEZ MUÑOZ

Napo - Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Keyko Daniela Loza Carvajal, con documento de identidad N° 0706767654, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Ecosistemas, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 06 de junio de 2023



Keyko Daniela Loza Carvajal
0706767654

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, KEYKO DANIELA LOZA CARVAJAL, con documento de identidad N° 0706767654, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: POSICIÓN FILOGENÉTICA Y DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE DE *PRISTIMANTIS* (ANURA: STRABOMANTIDAE) DE LA RESERVA BIOLÓGICA COLONSO CHALUPAS, NAPO, ECUADOR, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 06 de junio de 2023



Keyko Daniela Loza Carvajal

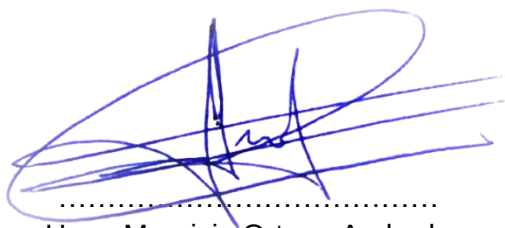
0706767654

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: Posición filogenética y descripción de una nueva especie de *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) de la reserva Biológica Colonso Chalupas, Napo, Ecuador, en la modalidad: artículo, fue realizado por: Keyko Daniela Loza Carvajal, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 06 de junio de 2023



Hugo Mauricio Ortega Andrade

CI: 1717270811

DEDICATORIA

A María Carvajal, mi madre, que me apoyó durante toda la carrera con cada consejo y motivación siendo un fuerte pilar para mí, ayudándome a levantar con mucho amor en cada tropiezo. Gracias por todo el esfuerzo y sacrificio para que pueda cumplir mis metas.

A mis padres, José Loza y Efrén Quiñonez. A mis hermanas y hermanos por ser mi mayor motivación, brindándome su apoyo a lo largo de mi formación.

A mis abuelas y tías, por darme fuerza con su amor incondicional. A mis abuelos que, aunque no estén sé que guiaron mis pasos y estarían orgullosos de mí.

A todas las personas ya mencionadas, gracias por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primera instancia a mi familia por ser siempre un apoyo incondicional a lo largo de todo el proceso de esta investigación.

A Félix Nieto por ayudarme a ser una mejor persona y profesional, por cada consejo y ayuda impartida hacia mi persona.

A mis maestros que compartieron su conocimiento con mucha pasión. En especial a mi tutor, Mauricio Ortega por ser un profesor de calidad y sembrar en mí el amor por los anfibios. Gracias por enriquecerme con sus conocimientos y valiosos consejos en diversas ocasiones de mi carrera con mucha paciencia y sentido del humor, convirtiéndose en un amigo más de la carrera universitaria.

Un agradecimiento muy grande a Mario Yáñez, por su disposición en la cotutoría de mi tesis. Por su dedicado trabajo en compartir sus conocimientos sobre identificación de especímenes y estatus taxonómicos, gracias por encaminarme y hacer más amena esta investigación.

Mis más sinceros agradecimientos a Jorge Brito, Miguel Urgilés y Mauricio Herrera por sus consejos, comentarios y por compartir durante la fase de campo sus grandes experiencias como investigadores. A Walter Quilumbaquin por compartir en diversas oportunidades sus conocimientos sobre Biología molecular y bioinformática.

Por último, gracias al grupo de Biogeografía y ecología espacial por financiar y acompañar esta investigación. A mis amigos maravillosos, por ser parte de cada fase en la vida universitaria.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MÉTODOS.....	2
<i>Declaración ética</i>	2
<i>Trabajo de campo</i>	2
<i>Muestreo de taxones</i>	3
<i>Análisis morfológicos</i>	3
<i>Datos genéticos</i>	4
<i>Análisis filogenético</i>	5
RESULTADOS.....	6
<i>Relaciones filogenéticas</i>	6
<i>Sistemática</i>	8
<i>Holotipo</i>	8
<i>Paratipos</i>	8

<i>Diagnosis</i>	9
<i>Comparación con otras especies</i>	10
<i>Descripción del holotipo</i>	12
<i>Coloración de holotipo en preservado</i>	14
<i>Coloración de holotipo en vida</i>	14
<i>Mediciones de holotipo (en mm)</i>	15
<i>Variación</i>	15
<i>Etimología</i>	19
<i>Distribución e historia natural</i>	20
<i>Estado de conservación</i>	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	23
AGRADECIMIENTOS	24
LITERATURA CITADA	25
ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distancias genéticas entre <i>P. paganus</i> sp. nov. y los taxones más cercanamente relacionados.	7
Tabla 2: Caracteres morfológicos cualitativos entre <i>P. paganus</i> sp. nov. y sus especies hermanas nominales.	17
Tabla 3: Medidas morfométricas de la serie tipo de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov.	6
Figura 2. Vistas dorsal, ventral y lateral del holotipo de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov.	8
Figura 3. Holotipo en vida de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov.	11
Figura 4. Detalle de la cabeza: vistas de perfil, dorsal, manos y pies de holotipo	13
Figura 5. Coloración dorso-lateral y ventral de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov.	16
Figura 6. Variación de coloración dorsal y ventral en preservado correspondiente a la serie tipo de <i>P. paganus</i> sp. nov.	20
Figura 7. Mapa de Ecuador con la distribución de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov., <i>P. prolatus</i> , <i>P. bicantus</i> , <i>P. sp. 1</i> , <i>P. sp. 2</i> , <i>P. sp. 3</i> y <i>P. nelsongalloi</i>	21
Figura 8. Hábitat y especímenes de <i>Pristimantis paganus</i> sp. nov.	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla 1. Números de acceso de Genbank correspondientes al clado al que pertenece <i>P. paganus</i> sp.nov.....	30
Figura 7. Filogenia completa del género <i>Pristimantis</i>	30

RESUMEN

Aproximadamente el 90% de especies del género *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) han sido descritas bajo enfoques morfológicos en las últimas décadas. Sin embargo, la complejidad taxonómica que posee este género se evidencia en la mayoría de estas descripciones. En base a este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la posición filogenética de *Pristimantis paganus* sp. nov., mediante análisis morfológicos y moleculares. El árbol filogenético se obtuvo por análisis de máxima verosimilitud a partir de los genes mitocondriales 16S, 12S, COI y el gen nuclear RAG1. Los resultados demuestran que *P. paganus* sp. nov. y sus especies hermanas forman un grupo monofilético con una alta divergencia genética (distancia *p* corregida < 4%) junto con otras especies del grupo *P. prolatus*. *P. paganus* sp. nov. se caracteriza morfológicamente por poseer una coloración dorsal homogéneamente negra, vientre marmoleado (menor intensidad en machos) y una mayor longitud hocico-cloaca (LRC) = machos (17.20–21.5 mm) - hembras LRC = (24.84–29.8 mm) dentro del grupo. *Pristimantis paganus* sp. nov., es una especie endémica de las estribaciones orientales de Ecuador pertenecientes a Napo y Pastaza. Este estudio destaca la importancia de documentar la biodiversidad dentro de la Reserva Biológica Colonso Chalupas.

PALABRAS CLAVE: Taxonomía integrativa, alopatría, diversidad críptica, variedad fenotípica.

ABSTRACT

Approximately 90% of species from the *Pristimantis* genus (Anura: Strabomantidae) have been described using morphological characters only. Nevertheless, the taxonomic complexity of this genus is evident in these descriptions. Based on this context, the present investigation aimed to determine the phylogenetic position of *Pristimantis paganus* sp. nov. by morphological and molecular analyses. The phylogenetic tree is obtained on likelihood maximum likelihood analyses from mitochondrial genes 16S, 12S, COI and the nuclear RAG1 gen. Results show that *P. paganus* sp. nov. and related species, form a monophyletic group with a high genetic divergence (distance p corrected <4%) along with other species from the *P. prolatus* group. *P. paganus* sp. nov. is morphologically characterized by its black homogeneous dorsal coloration, a marble belly (less intensity for males), and a bigger size (males (SVL 17.20–21.5 mm) - females (SVL 24.84–29.8 mm)) within the group. *P. paganus* sp. nov. is an endemic species from the eastern foothills of Napo and Pastaza provinces. This study underlines the importance of documenting biodiversity within the Colonso Chalupas Biological Reserve.

KEYWORDS: Integrative taxonomy, allopatry, cryptic diversity, phenotypic variety.

**Posición filogenética y descripción de una nueva especie de
Pristimantis (Anura: Strabomantidae) de la reserva Biológica
Colonso Chalupas, Napo, Ecuador**

Keyko Loza¹, Mauricio Ortega¹, Mario Yáñez².

- ¹ Facultad de Ciencias de la vida, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador.
- ² Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO), Quito, Pichincha, Ecuador.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios en Ecuador conforman uno de los componentes más ricos en cuanto a la fauna de vertebrados, con un total de 671 especies reportadas [1]. Entre ellas, el género *Pristimantis* (Strabomantidae), uno de los géneros de desarrollo directo más diversos y ampliamente distribuidos en el Neotrópico, con 254 especies formalmente descritas en Ecuador [2]. Sin embargo, según la Lista Roja de anfibios de Ecuador, un 60% de estas especies se encuentran en alguna categoría de amenaza [3]. Además, debido a la complejidad taxonómica, filogenias incompletas y a la alta variedad fenotípica que posee el género, se estima que su diversidad se encuentra subestimada[4].

En general, la descripción de nuevas especies de este género ha aumentado considerablemente en las últimas dos décadas [5-8]. No obstante, alrededor del 90% han sido descritas o reportadas bajo un enfoque tradicional de taxonomía morfológica [7,9-14]. Hasta 2018, la mayoría de las especies de este género descritas en Ecuador tuvieron una asignación preliminar errónea dentro del género *Eleutherodactylus* [11]. De la misma manera *Pristimantis prolatus* dentro del grupo *Pristimantis unistrigatus* [2] y *Pristimantis bicantus* y *Pristimantis nelsongalloi* en el grupo *myersi* [26-27].

En contraste, la taxonomía integrativa se refiere al estudio de múltiples fuentes de evidencia para reconocer y establecer límites entre especies [15]. De este modo, la aplicación combinada de caracteres moleculares y morfológicos ha demostrado ser útil para delimitar y describir especies nuevas dentro de este grupo de anfibios [7]. Desde una perspectiva taxonómica, la descripción y delimitación de especies es importante puesto que aporta información para estimar el estado de conservación de linajes especialmente de grupos morfológicamente crípticos.

En los Andes orientales de Ecuador, el Parque Nacional Llanganates (PNLL) y la Reserva Biológica Colonso Chalupas (RBCC) han sido exploradas en los últimos años, donde se han registrado diversidad críptica asociada a ranas *Pristimantis* [16,17]. La conservación de estas áreas es importante puesto que albergan una gran diversidad de especies que pertenecen a ecosistemas sensibles incluyendo zonas de páramo. No obstante, en la RBCC la mayor parte del territorio se encuentra inexplorado, estimándose que existe un vacío de información en el área [18]. A pesar de ser una zona protegida, en 2021 se han registrado puntos de actividad minera dentro de la misma [19].

Adicionalmente, aunque Ecuador es un país megadiverso también es uno de los que mayor explotación forestal presenta. Estos hechos, afectan negativamente a las poblaciones de anfibios, los cuales presentan una alta vulnerabilidad a alteraciones de origen antrópico[20]. Así, el descubrimiento y estado de conservación de nuevas especies podría fortalecer las estrategias de manejo y protección de esta región. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la posición filogenética y el estado taxonómico de una especie de rana *Pristimantis* proveniente de la Reserva Biológica Colonso Chalupas, de la provincia de Napo, Ecuador basada en líneas de evidencia morfológica y genéticas.

MÉTODOS

Declaración ética

En esta investigación se colectaron especímenes y se obtuvieron muestras de tejido siguiendo protocolos técnicos propuestos por Heyer et al. [21]. Los especímenes colectados fueron depositados en el Instituto de Biodiversidad del Ecuador, bajo los permisos MAE-DNB-CM-2016-0045, 2017-0062 y 2019-0120 emitidos por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador.

Trabajo de campo

Los muestreos en campo se llevaron a cabo en 2016 (0.93527° S; 77.92683° W, 2206 msnm), 2017 y 2021 (0.93829° S; 77.94833° W, 2157 msnm) en la Reserva Biológica Colonso Chalupas, Provincia de Napo, Ecuador. Durante el 12 al 24 diciembre de 2021, se realizaron colecciones en el Cerro de Abitagua (1.36217° S, 78.10865° W; 2200 m),

Parque Nacional Llanganates, Provincia de Pastaza, Ecuador.

Los especímenes recolectados fueron fotografiados vivos y luego fijados en menos de 24 horas después de su captura. Para la fijación de especímenes se usó formalina al 10% y se preservaron en alcohol al 70%. Previamente, se realizó la extracción de tejido hepático, mismos que fueron etiquetados con el respectivo código de campo y almacenados en alcohol al 96%. Se tomaron notas sobre la ecología, latitud, longitud, altitud usando un GPS Garmin® Montana 650.

Muestreo de taxones

El material colectado fue examinado y comparado con especímenes depositados en las colecciones Herpetológicas del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad, Quito (DHMECN) [22]. La terminología taxonómica sigue la propuesta de Duellman y Lehr [23].

Análisis morfológicos

Las medidas morfométricas se tomaron con un calibrador electrónico (precisión $\pm 0,01$ mm, redondeado a 0,1 mm). Se tomaron las siguientes medidas morfológicas [23]: (1) longitud hocico-cloaca (LRC) = distancia desde la punta del hocico hasta el margen posterior de la cloaca; (2) ancho de la cabeza (AC) = mayor ancho de la cabeza medido al nivel de la articulación de la mandíbula; (3) longitud de la cabeza (LC) = distancia desde la punta del hocico hasta el ángulo posterior de la articulación de la mandíbula, donde toque los puntos de referencia con las puntas de las pinzas; (4) diámetro horizontal del ojo (DO) = distancia entre los bordes anterior y posterior del ojo; (5) distancia interorbital (DIO) = la amplitud del cráneo entre las órbitas; (6) distancia ojo-fosa nasal (DON) = distancia desde el margen posterior de la fosa nasal hasta el margen anterior del ojo; (7) diámetro timpánico (DT) = distancia entre los márgenes externo anterior y posterior del anillo timpánico; (8) longitud de la tibia (LT) = longitud de la pierna desde la rodilla hasta el talón; (9) ancho del párpado (AP) = distancia perpendicular del párpado superior; (10) longitud del fémur (LF) = longitud del fémur desde la cloaca hasta la rodilla; (11) longitud del pie (LP) = distancia desde el talón hasta la punta del dedo del pie IV, incluida en la medición la longitud del tarso y el pie; (12) longitud de la mano (LM) = desde el borde proximal del tubérculo palmar hasta la punta del dedo III; (13) ancho del disco del dedo III (IIIDM) = medido a través de la parte más ancha del disco III; (14)

ancho del disco del dedo IV (IVDP) = medido a través de la parte más ancha del disco IV. Los dedos fueron numerados de forma preaxial a postaxial de I a IV. Se determinaron las longitudes comparativas de los dedos del pie III y V, ambos comparados con el dedo del pie IV; se estimaron las longitudes de los dedos I y II comparados entre sí. El sexo, la madurez de los especímenes y la condición reproductiva se delimitaron mediante la identificación de hendiduras vocales, tamaño y a través de la observación directa de gónadas mediante un corte dorsolateral. El color en vida se determinó en base a fotografías tomadas en el campo.

Datos genéticos

Se extrajo ADN de tejido hepático de 4 individuos (DHMECN 15588, DHMECN 15589, DHMECN 15590, DHMECN 15591) utilizando un método de aislamiento con el kit Promega Wizard™ SV Genomic DNA Purification System (<https://www.fishersci.ca/shop/products/promega-wizard-sv-genomic-dna-purification-system-3/pr2361>), siguiendo el manual del fabricante. Se amplificaron a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) secuencias de tres genes mitocondriales (16S, 12S y Citocromo oxidasa subunidad 1 - COI) y un gen nuclear activador de recombinación (RAG1). Dichos marcadores moleculares forman parte del código de barras de ADN universal en anfibios [24]. De este modo, combinar genes mitocondriales altamente conservados y genes nucleares con tasas mutacionales menores permite obtener una filogenia más robusta.

El gen 16S se amplificó usando los cebadores: **16sSar-L**(CGCCTGTTTATCAAAAACAT)/**16sSbr-H** (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT) [25]. Para el gen 12S se utilizó **12sL4E**(TACACATGCAAGTYTCCGC)/**12sH10** (CACYTTCCRGTRCRYTTACCRTGTTACGACTT) [26]. El gen COI fue amplificado utilizando los cebadores: **dgLCO-1490** (GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG)/**dgHCO** (TAAACTTCAGGGTGACCAAARAYCA) [27]. Finalmente, el gen RAG se amplificó con los cebadores: **RAG1-R182** (GCCATAACTGCTGGAGCATYAT)/**RAG1-R270** (AGYAGATGTTGCCTGGGTCTTC) [26].

Se usaron alineaciones de genes concatenados con el software Geneious Prime v2022.0.1 [28] para ensamblar secuencias en las direcciones 5' a 3' y viceversa de los genes 16S, 12S, COI y RAG1. La secuenciación fue llevada a cabo en la empresa

Macrogen (Correa del Sur). Las nuevas secuencias generadas (Anexo Tabla 1) se alinearon con todas las secuencias disponibles para el género *Pristimantis* depositadas en GenBank hasta la fecha (17-12-2022) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). La calidad de los datos de ADN se editó manualmente en el software Geneious Prime v2022.0.1 [28] antes del alineamiento múltiple, eliminando los “gaps” de las secuencias para reducir el ruido en la hipermatriz.

Análisis filogenético

El alineamiento de las secuencias múltiples de cada gen se realizó utilizando el servidor en línea MAFFT v7.017 (Multiple Sequence Alignment) [29] con parámetros por defecto. Se seleccionaron a *Epipedobates boulengeri*, *Craugastor longirostris* y *Niceforonia elassodiscus* como grupos externos para ubicar la raíz de la filogenia por ser más ancestrales con respecto al género *Pristimantis* [23]. La matriz final concatenada se realizó en Mesquite v3.61 [30] la cual contenía 1177 terminales con 3100 pb (998 pb para 16S; 846 pb para 12S; 615 pb para COI y 641 pb para RAG1).

Se usó un algoritmo de máxima verosimilitud (Ilikelihood) en IQTree v2.2.0 web-server [31]. Los modelos de sustitución nucleotídica se estimaron con ModelFinder [32] implementado en el servidor de IQTree, para un total de 8 particiones, uno para cada gen no codificante (12S y 16S) y uno para cada codón de los genes que codifican (COI y RAG1). El valor de soporte de Ultrafast Bootstrap (UfBoot), Shimodaira–Hasegawa like approximate likelihood ratio test (SH-aLRT) y approximate Bayes Test (aBayes) se evaluó usando 1000 réplicas de arranque ultrarrápidas. Los valores se definieron como “fuertes” únicamente cuando SH-aLRT $\geq$ 80% [33] y UFboot $\geq$ 95% [34]. Finalmente, la filogenia fue editada utilizando el programa FigTree v1.4.2 [35]. Las distancias genéticas por pares entre la nueva especie y las especies asociadas al clado fueron estimadas en Geneious Prime v2022.0.1 [28].

RESULTADOS

Relaciones filogenéticas

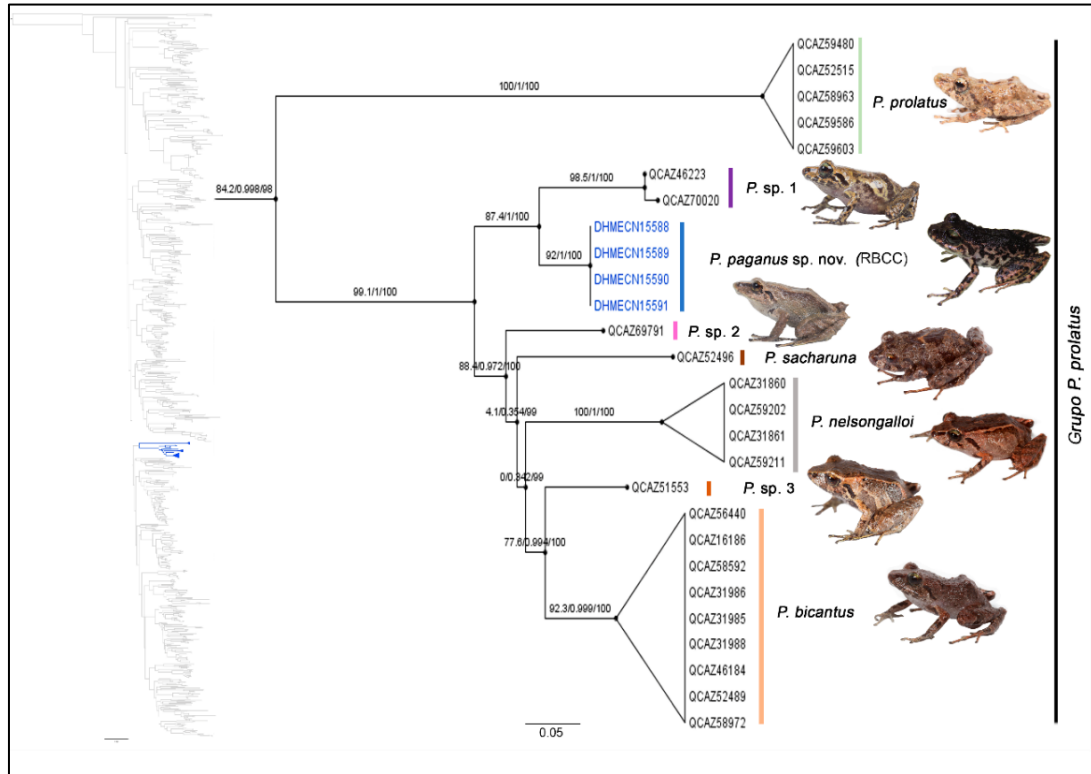


Figura 1. (A) Árbol filogenético del género *Pristimantis* obtenido a partir de genes mitocondriales 12S, 16S, COI y RAG1 (Filogenia completa en Anexo, Figura 7).

(B) Relaciones filogenéticas de *P. paganus* sp. nov., fragmento del árbol de máxima verosimilitud (ramas azules). Los valores de soporte SH-aLRT support (%) / aBayes support / ultrafast bootstrap support (%) se muestran para cada rama. Las secuencias generadas para la especie evaluada se muestran con texto azul. El número de espécimen voucher para cada terminal se muestra antes del nombre de la especie. RBCC = Reserva Biológica Colonso Chalupas. Fotografías: *Pristimantis paganus* sp. nov.: Hugo Mauricio Ortega Andrade (HMOA); otras especies en el clado: Pontificia Universidad Católica del Ecuador-BIOWEB, <https://bioweb.bio> [1].

Las relaciones filogenéticas inferidas del análisis de máxima verosimilitud dieron como resultado un clado con alto valor de soporte (SH-aLRT=84.2%, aBayes=0.9, UfBoot =98%). La posición filogenética de las poblaciones estudiadas, respalda el diagnóstico morfológico mostrando un soporte alto dentro del género *Pristimantis*. La filogenia muestra que *P. paganus* sp. nov. forma un grupo monofilético y es especie hermana de una especie con incertidumbre taxonómica *P. sp. 1*, anidándose con un valor de soporte

de 100%. Ambas son hermanas de *P. bicantus*, *P. nelsongalloi*, *P. sacharuna* y dos especies no descritas *P. sp. 2*, *P. sp. 3*. Este clado de siete especies conforman el clado hermano de *P. prolatus*. A este nuevo grupo de especies, se asigna el nombre *Pristimantis prolatus*, por ser la primera especie descrita del clado (UfBoot =100) [2].

Tabla 1. Distancias genéticas interespecíficas e intraespecíficas (valores en diagonal, en negrita) entre *P. paganus* sp. nov. y los taxones más cercanamente relacionados. Valores mínimos y máximos.

	<i>P. paganus</i> sp. nov.	<i>P. sp. 1</i>	<i>P. sp. 2</i>	<i>P. sp. 3</i>	<i>P. sacharuna</i>	<i>P. nelsongalloi</i>	<i>P. bicantus</i>	<i>P. prolatus</i>
<i>P. paganus</i> sp. nov.	0.00							
<i>P. sp. 1</i>	0.045 – 0.049	0.004						
<i>P. sp. 2</i>	0.071	0.086 – 0.090	0.00					
<i>P. sp. 3</i>	0.078	0.093 – 0.097	0.063	0.00				
<i>P. sacharuna</i>	0.091	0.106 – 0.110	0.076	0.077	0.00			
<i>P. nelsongalloi</i>	0.087 – 0.104	0.103 – 0.124	0.073 – 0.090	0.068 – 0.085	0.087 – 0.103	0.00 – 0.019		
<i>P. bicantus</i>	0.079 – 0.093	0.095 – 0.112	0.065 – 0.078	0.049 – 0.063	0.078 – 0.092	0.070 – 0.101	0.00 – 0.025	
<i>P. prolatus</i>	0.231 – 0.239	0.251 – 0.258	0.235 – 0.242	0.242 – 0.249	0.255 – 0.263	0.252 – 0.276	0.242 – 0.257	0.00 – 0.007

Elaborado por: Loza, Keyko, 2023.

Además, la comparación de las distancias genéticas es mayor al 4% (distancia mínima 4%, máxima 23%) siendo el porcentaje mínimo con relación a su especie más cercana *P. sp 1* (Figura 1, Tabla 1).

Sistemática

Pristimantis paganus sp. nov.

(Figuras 2-6)

Nombre común en español: *Cutín pagano amazónico.*

Nombre común en inglés sugerido: *Amazonian pagan rainfrog*

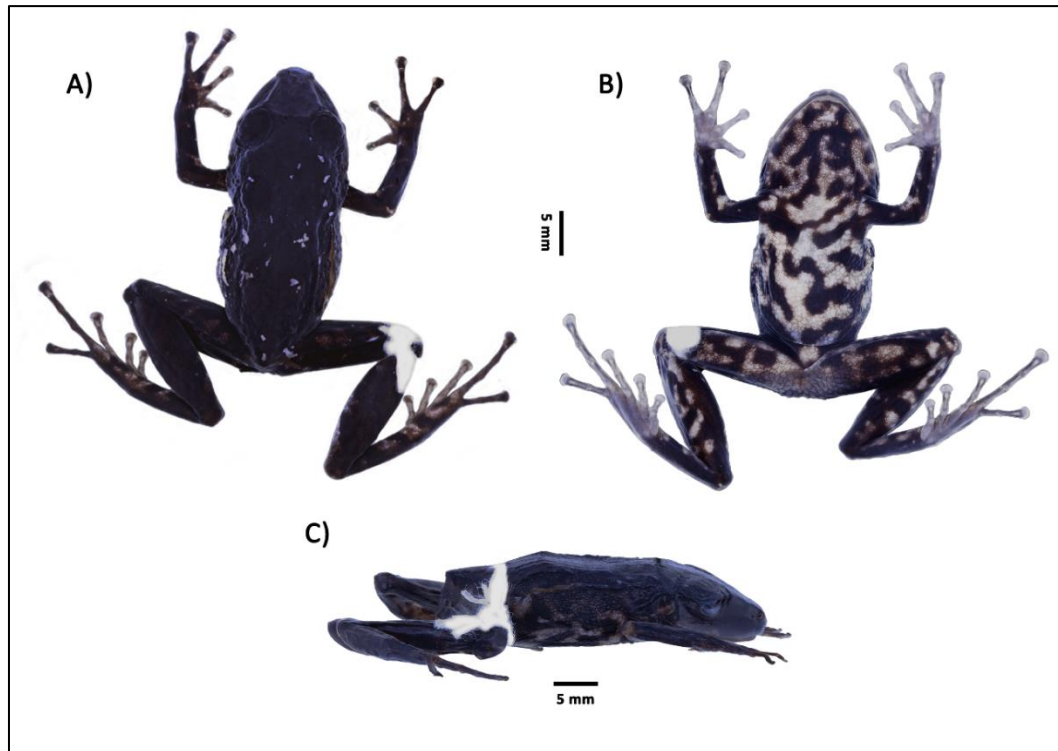


Figura 2. Vistas dorsal, ventral y lateral del holotipo (DHMECN 16810) de *Pristimantis paganus* sp. nov., hembra adulta en preservado (LRC = 27.2 mm).

Fotografía: Mario H. Yáñez-Muñoz (MYM).

Holotipo

DHMECN 16810, hembra adulta, colectada en la Reserva Biológica Colonso Chalupas. Sector Cerro Colonso (0.923621° S, -77.956647° W, 2214 msnm), Cantón Tena, provincia de Napo, Ecuador, el 24 de noviembre de 2021, por Mario H. Yáñez-Muñoz; Miguel Urgilés; Jorge Brito; H. Mauricio Ortega-Andrade, Mauricio Herrera y Keyko Loza.

Paratipos

Un total de 7 hembras, 13 machos y 3 juveniles. Hembra adulta colectada en la misma

localidad del holotipo, DHMECN 16811, 25-11-2021; Machos colectados en la misma localidad del holotipo DHMECN 16812, DHMECN 16813, DHMECN 16814, 25-11-2021 por Mario H. Yáñez Muñoz; Miguel Urgilés; Jorge Brito; Mauricio Ortega-Andrade, Mauricio Herrera y Keyko Loza.; DHMECN 15592, DHMECN 15593, DHMECN 15594, DHMECN 15595 0.93527° S, 77.92683° W, 2207 m.s.n.m.) machos colectados por Jimmy Velasteguí, Grace Reyes, Michelle Guachamin y H. Mauricio Ortega-Andrade, 17-10-2016; DHMECN 15596, DHMECN 15599, DHMECN 15603 juveniles colectados, DHMECN 15598, DHMECN 15600, DHMECN 15606 hembras colectadas, DHMECN 15597, DHMECN 15601, DHMECN 15602, DHMECN 15604, DHMECN 15605 machos colectados 18-06-2017 por Miguel Gómez y H. Mauricio Ortega-Andrade (0.93829° S, 77.94833° W, 2157 m.s.n.m.); DHMECN 17223 macho colectado (01-12-2021), DHMECN 17221 (28-11-2021), DHMECN 17222 (29-11-2021) colectados por Zane Libke, Eli Bieri, Kira Miller, Sara Dykman, Henry Sanchez, Vicente Sanchez, Jordi Salazar, Kira Miller, Sara Dykman (1.36217° S, 78.10865° W), Cerro de Abitagua, Parque Nacional Llanganates el 24 de Diciembre de 2021.

Diagnosis

Pristimantis paganus sp. nov. (Figuras 2-6) se caracteriza por la siguiente combinación de caracteres: (1) Piel del dorso finamente granular con verrugas aplaneadas alineadas dorso-lateralmente, vientre aerolado, pliegue discoidal presente visible posteriormente, pliegues dorsolaterales finamente definidos y discontinuos en hembras, definidos continuos en machos; pliegue escapular en forma de W definido en machos; (2) tímpano presente, membrana timpánica y anillo timpánico bien definidos, redondo, el diámetro horizontal del tímpano equivale al 38% del diámetro del ojo, margen anterodorsal con un pliegue supratimpánico y tubérculos postrictales subcónicos grandes; (3) hocico corto, subacuminado en vista dorsal, redondeado de perfil con labios ligeramente acampanados; (4) párpado superior con al menos tres a cuatro tubérculos grandes redondeados rodeados por varios tubérculos pequeños redondeados, dos tubérculos subcónicos detrás de cada ojo; sin cresta craneal; (5) procesos dentígeros del vómer presentes, oblicuos de contorno cada proceso con 3 - 8 dientes; (6) hendiduras vocales indistintas; sin almohadilla nupcial y sin saco vocal; (7) dedo I de mano más corto que el dedo II; discos anchos, expandidos dilatados con surcos circunmarginales; (8) dedos de las manos con finos rebordes cutáneos laterales; (9) tubérculos ulnares ausentes; (10) talón con un tubérculo subcónico; borde externo con dos tubérculos aplanados, pliegue tarsal ausente; (11) tubérculo metatarsal interno oval en hembras 3 veces más grande

que el tubérculo metatarsal externo redondeado; tubérculos supernumerarios ausente; (12) dedos del pie con finos rebordes cutáneos presentes, membrana interdigitales ausentes, dedo V del pie más largo que el dedo III; (13) hembras dorsalmente negro con distintivas marcas en los flancos y garganta rosáceo (crema grisáceo en vida). Machos dorsalmente cafés con marcas café oscuras en forma de W y en forma de V invertida en el dorso, con manchas café anaranjado en la región nasal e inserciones de axilas e ingles. Machos y hembras con el vientre moteado negro; (14) machos adultos pequeños (LRC 17.20 – 21.5 mm, media = 19.59, n= 13), hembras (LRC 24.84 – 29.8 mm, media = 29.56 mm, n= 7), juveniles (LRC 13.54 – 16.71 mm, media = 15.46 mm, n= 3) (Tabla 2-3).

Comparación con otras especies

La nueva especie se diferencia de sus linajes nominales cercanos (*P. prolatus*, *P. bicantus*, *P. nelsongalloi* y *P. sacharuna* [1,13,16,36] por la presencia de pliegues dérmicos en el dorso finamente definidos y discontinuos (dorsolaterales en *P. bicantus*, *P. nelsongalloi*, en forma de “H” en *P. prolatus* y en forma de “^” en *P. sacharuna*) y por su tamaño corporal (Tabla 2-3). Además, el distintivo patrón de coloración en hembras de dorso homogéneamente negro lo distingue de sus especies relacionadas y de otras especies de *Pristimantis* de los bosques montanos orientales de Ecuador [1] (Figura 3).

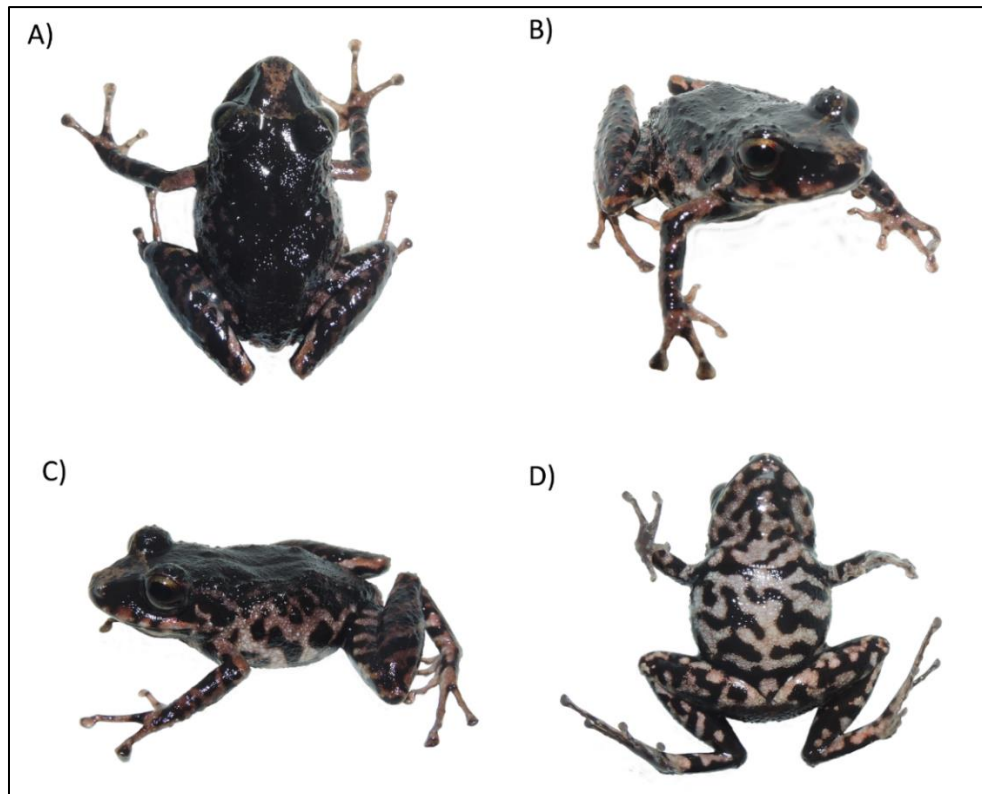


Figura 3. Holotipo en vida de *Pristimantis paganus* sp. nov., (hembra adulta; DHMECN 16810, LRC = 27.2 mm).

Fotografía: HMOA.

A) Vista dorsal; B) Vista frontal; C) Vista lateral; D) Vista ventral.

Específicamente *P. paganus* sp. nov. se diferencia de *P. nelsongalloi*, *P. bicantus* (caracteres de estas especies entre paréntesis) por la presencia del párpado superior con al menos tres a cuatro tubérculos grandes redondeados (aplanados en *P. nelsongalloi*, no cónicos en *P. bicantus*), tubérculos postrictales subcónicos grandes (subcónicos y pequeños en *P. nelsongalloi* y *P. bicantus*), pliegue supratimpánico grueso (definido y delgado en *P. nelsongalloi* y *P. bicantus*), discos truncados (lanceolados en *P. nelsongalloi* y ligeramente expandidos en *P. bicantus*), rebordes cutáneos de los dedos de las manos y pies presentes finamente definidos (ausentes en *P. nelsongalloi*, *P. bicantus*).

Por otro lado, difiere de *P. sacharuna* por la presencia de pliegue interocular (ausente en *P. sacharuna*), presencia del párpado superior con al menos tres a cuatro tubérculos grandes redondeados (uno subcónico en *P. sacharuna*), discos truncados (forma discontinua, expandidos en los dedos III y IV, redondeado en el dedo II y levemente expandido en el dedo I en *P. sacharuna*), tubérculos ulnares ausentes (presentes, subcónicos en *P. sacharuna*), cresta dérmica ausente (cresta dérmica en forma de “Λ”

en *P. sacharuna*). Finalmente, se puede diferenciar de *P. prolatus* por presentar el hocico en vista dorsal subacuminado (acuminado en *P. prolatus*), párpado superior con al menos tres a cuatro tubérculos grandes redondeados (uno cónico en *P. prolatus*), cresta dérmica ausente (cresta dérmica en forma de “H” en *P. prolatus*), discos truncados (expandidos en *P. prolatus*). Otras diferencias son mencionadas en la Tabla (4).

Descripción del holotipo

Hembra adulta (Figura 2-4), cabeza más larga que ancha. Hocico corto, subacuminado en vista dorsal, redondeado de perfil; labios acampanados, distancia ojo-narina 12% de la LRC, canto rostral recto, definido, región loreal cóncava, narinas protuberantes dirigidas lateralmente; área interorbital plana, sin pliegue interorbital, distancia interorbital más ancha que el párpado superior, equivale al 90%; sin cresta craneal; párpado superior con al menos tres a cuatro tubérculos grandes redondeados, tímpano presente, membrana timpánica diferenciada de la piel que lo rodea, anillo timpánico evidente rodea la $\frac{1}{2}$ de la membrana timpánica, margen superior cubierto por pliegue timpánico grueso, tímpano visible dorsalmente, diámetro del tímpano equivale al 38% del diámetro del ojo, parte inferior del tímpano con tubérculos postrictales subcónicos grandes; coanas pequeñas de contorno oval, no cubiertas por piso palatal del maxilar; procesos dentígeros del vómer presentes oblicuos de contorno con 4 a 8 dientes, lengua tan ancha como larga, ligeramente acorazonada 40% adherida al piso de la boca.

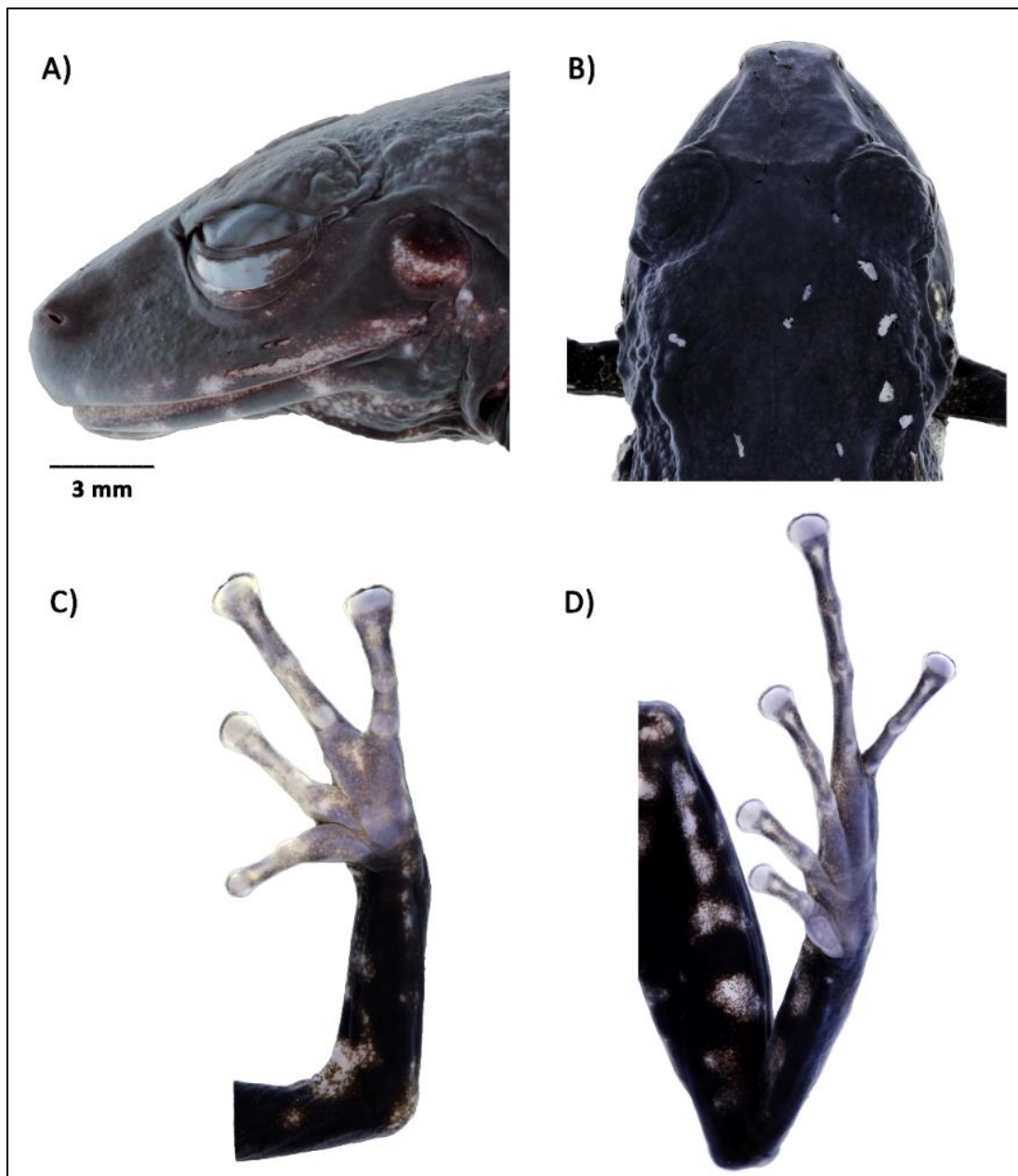


Figura 4. Detalle de la cabeza: vistas de perfil (A), dorsal (B), manos (C) y pies (D) de holotipo DHMECN (16810).

Fotografía: MYM.

Textura del dorso finamente granular con verrugas aplanadas alineadas dorso-lateralmente, vientre aerolado con pliegues dorsolaterales finamente definidas y discontinuos, pliegue discoidal presente visible posterior o ventralmente, cloaca con textura granular; brazos esbeltos sin tubérculos en la superficie dorsal y ventral del antebrazo. Tubérculos ulnares ausentes; Discos anchos truncados en los dedos II al IV, con hendiduras circummarginales, tubérculos subarticulares redondeados y aplanados en vista lateral con finos rebordes cutáneos laterales, tubérculo tenar ovalado con tubérculo palmar acorazonado, superficie palmar sin tubérculos supernumerarios con micro-

granulaciones dispersas en las manos, extremidades posteriores esbeltas, la longitud de la tibia equivale al 56% de la LRC, sin tubérculo en el borde externo de la tibia, con un pequeño tubérculo subcónico en el talón, pliegue tarsal interno ausente, dedos con finos rebordes cutáneos, en los dedos I – V, sin membranas digitales; tubérculos subarticulares redondos y aplanados en vista de perfil; discos expandidos en todos los dedos del pie, más grandes que los de la mano. Dedo pedial V más largo que el III, no se extiende hasta más allá del tubérculo subarticular del dedo IV.

Coloración de holotipo en preservado

Superficie dorsal extremidades delanteras y posteriores, homogéneamente negra con una fina banda interorbital de color café cremoso. Borde interno de la inserción del brazo y antebrazo, superficies dorsales y bases de los dedos I y II café grisáceo, flancos marmoleados con marcas crema grisáceo, ventralmente con coloración crema grisáceas en las superficies de vientre, garganta, muslos y tibia, vientre en fondo crema moteado con marcas negras, garganta en fondo crema y manchas café con grandes marcas negras, superficies dorsales de los muslos con bandas negras separadas por interespacios de color café claro. Línea crema grisácea en el labio superior entrecortada, discontinua por interespacios de color negro. Labio inferior en fondo negro separadas por tres bandas marcas crema grisáceas.

Coloración de holotipo en vida

Superficie dorsal extremidades delanteras y posteriores, homogéneamente negra con una fina banda interorbital de color café claro rosáceo, patrón irregular que se extiende en el margen delantero del párpado hasta la punta del hocico. Borde interno de la inserción del brazo, ante brazo, superficies dorsales laterales, muslos y vientre café rosáceo con manchas negras, coloración crema rosáceo en las superficies del vientre, garganta, muslos y tibia, vientre y garganta en fondo crema grisáceo moteado con grandes marcas negras y manchas café claras, superficies dorsales de los muslos con bandas negras separadas por interespacios de color café rosáceo, muslos. Línea café rosácea con pequeñas manchas rosáceas más pronunciadas en el labio superior entrecortada, discontinua por interespacios de color negro. Labio inferior en fondo negro separadas por bandas crema.

Mediciones de holotipo (en mm)

LRC = 27.23; AC = 10.24; LC = 11.21; DO = 3.92; DIO = 2.59; DON = 3.2; AP = 2.86; DT = 1.51; LT = 15.45; LF = 13.49; LP = 13.54; LM = 8.10; IIIDM = 1.18; IVDP = 1.15

Variación

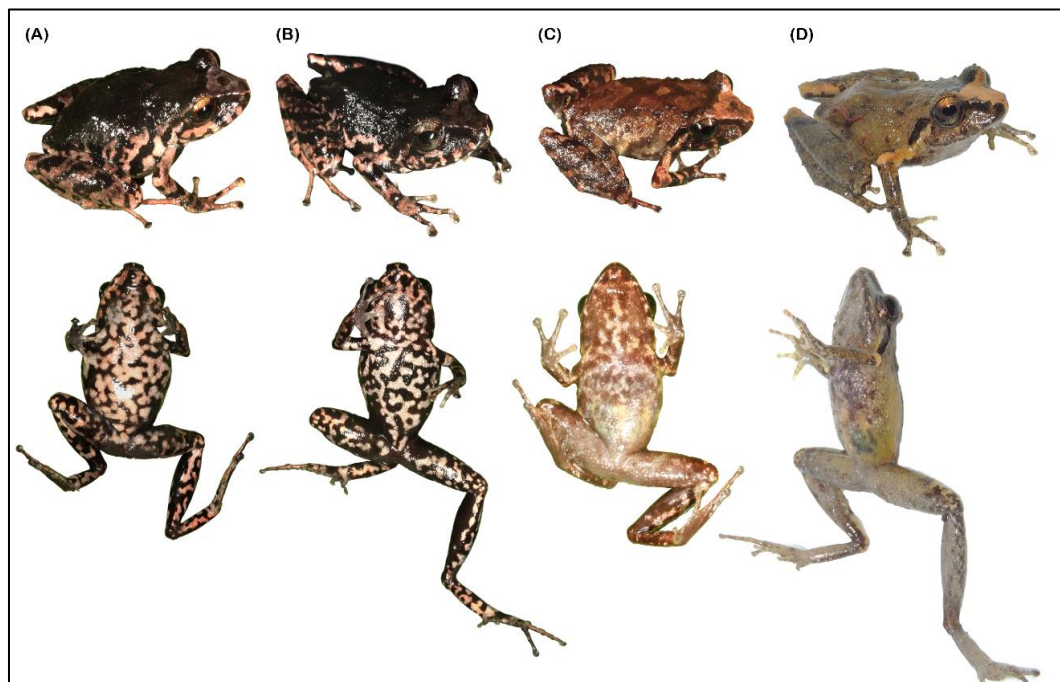


Figura 5. Coloración dorso-lateral y ventral de *Pristimantis paganus* sp. nov., numeración de columnas de izquierda a derecha.

Fotografía: HMOA-MYM.

A) DHMECN 15598, hembra, paratipo (LRC = 29.2 mm). B) DHMECN 15600, hembra, paratipo (LRC = 29.8 mm). C) DHMECN 15601, macho, paratipo (LRC = 20.1 mm). D) DHMECN 16813, macho, paratipo (LRC = 17.20 mm).

Pristimantis paganus sp. nov., presenta dimorfismo sexual en tamaño corporal y coloración (Figura 5, 6). Las medidas morfométricas de la serie tipo se detalla en la Tabla 3. Los machos de esta especie poseen un tamaño significativamente más pequeño que las hembras (Tabla 3). En vida, se ha observado que existe una variación notable entre ambos sexos. Las hembras presentan un color café grisáceo claro en la región nasal desde la zona interorbital de la cabeza hasta la punta del hocico, en los machos esta coloración es café anaranjado, cabe mencionar que el 40% de los especímenes presentaron además una pequeña mancha oscura en el centro (Figura 5).

Tabla 2. Caracteres morfológicos cualitativos utilizados para la comparación de la nueva especie y sus especies hermanas nominales.

Especie	Forma de los discos	Rebordes cutáneos laterales de la mano	Tubérculos ulnares	Tubérculos en el talón	Tubérculos en el borde externo del tarso	Tubérculo matatarsal interno	Tubérculo metatarsal externo	Tubérculos supernumerarios	Rebordes cutáneos laterales del pie	Condición del dedo V del pie	Tamaño (mm)	
											Hembra	Macho
<i>P. paganus</i> sp. nov.	Truncados	Presentes	Ausente	Presente, un tubérculo subcónico	Presentes, dos tubérculos aplanados	Presente, ovalado en hembras	Presente, redondeado	Ausentes	Presente	B	24.84 – 29.8	17.20 – 21.5
<i>P. prolatus</i>	Expandidos	Ausentes	Ausente	Presente, cónicos	Presente, múltiples tubérculos cónicos	-	-	-	Ausentes	-	20.8–24.1	13.7–18.4
<i>P. sacharuna</i>	Ligeramente más anchos que los dígitos, expandidos (dedos III y IV), redondeado (Dedo II) y levemente expandido (Dedo I).	Presentes	Presentes, subcónicos	Presente, un tubérculo subcónico	Presente, dos a 3 tubérculos subcónicos	Presente, ovalado	Presente, subcónico	Ausentes	Presente	B	18.5–19.5	-
<i>P. nelsongalloi</i>	Lanceolados	Ausente	Presentes, pequeños	Presente, uno subcónico y varios tubérculos pequeños	Presente, prominente rodeado de varios pequeños	Presente, ovalado y ligeramente elevado	Presente, subcónico y redondo	Presentes	Ausentes	B	12,0–17,0	18,5–21,7
<i>P. bicantus</i>	Ligeramente expandidos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente, ovalado	Presente, redondeado	-	Ausentes	B	17,0–21,7	12,0–15,8

Elaborado por: Loza, Keyko, 2023.

Tabla 2. (continuación).

Especie	Pliegue interocular	Hocico en vista dorsal	Hocico en vista de perfil	Tubérculos en el párpado	Procesos dentígeros del vómer	Hendiduras vocales	Dedo I de la mano
<i>P. paganus sp. nov.</i>	Ausente	Subacuminado	Redondeado	Presentes, 3 a 4 tubérculos redondeados rodeados de varios pequeños	Oblicuos	Indistintas	I<II
<i>P. prolatus</i>	Ausente	Acuminado	Casi truncado	Presente, uno cónico	Prominentes, oblicuos y ovales	Presentes en machos	I<II
<i>P. sacharuna</i>	Presente	Subacuminado	Ligeramente redondeado	Presente, uno subcónico	-	Desconocidas	I<II
<i>P. nelsongalloi</i>	Ausente	Subacuminado	Redondeado	Presentes, cuatro o cinco supraoculares pequeños, planos y bajos	Bajos, oblicuos	Ausentes	I<II
<i>P. bicantus</i>	Ausente	Redondeado	Redondeado	Presentes, tubérculos bajos	Prominentes, oblicuos	Presentes en machos	I<II

Elaborado por: Loza, Keyko, 2023.

Tabla 3. Medidas morfométricas en milímetros de la serie tipo de *Pristimantis paganus* sp. nov.

Medidas	Machos n = 13	Hembras n = 7	Juveniles n = 3
LRC	18.10–21.50 (19.59 ±1.33)	24.84–29.8 (28.18±1.93)	13.54–16.71 (15.46±1.37)
AC	6.52–7.97 (7.6±0.56)	9.52–11.80 (10.66±0.76)	5.61–6.33 (5.96±0.29)
LC	7.08–8.89 (8.3±0.56)	9.75–11.9 (10.97±0.6)	6.63–7.14 (6.80±0.23)
DO	2.89–4.00 (3.85±0.21)	3.73–4.9 (4.23±0.49)	2.35–3.24 (2.91±0.40)
DIO	2.04–2.70 (2.6±0.14)	2.59–3.08 (3.32±0.55)	1.72–2.05 (1.96±0.17)
DON	1.8–2.69 (2.2±0.56)	3.2–3.85 (2.53±0.40)	1.54–1.90 (1.77±0.16)
AP	1.76–3.00 (2.35±0.35)	1.92–3.20 (2.53±0.40)	1.26–1.47 (1.34±0.09)
DT	0.84–1.70 (1.70±0.2)	1.45–2.30 (1.70±0.26)	1.84–0.93 (0.89±0.04)
LT	9.71–11.90 (11.5±0.56)	15.07–16.60 (15.72±0.59)	7.44–9.54 (8.69±0.90)
LF	8.77–1.54 (9.6±0.84)	13.30–14.60 (13.89±0.43)	7.13–8.64 (7.88±0.61)
LP	8.23–10.77 (9.20±1.13)	13.38–14.7 (13.78±0.43)	6.76–7.87 (7.43±0.48)
LM	4.78–6.76 (5.55±0.49)	7.27–8.40 (8.09±0.35)	3.83–4.99 (4.46±0.47)
IIIDM	0.76–1.10 (0.95±0.21)	1.11–1.40 (1.20±0.10)	0.66–0.72 (0.68±0.02)
IVDP	0.51–0.98 (0.8±0.14)	0.87–1.00 (1.04±1.10)	0.57–0.63 (0.60±0.02)

Elaborado por: Loza, Keyko, 2023.

Rango de medidas (máximo, mínimo, media y $\pm$ desviación estándar). Abreviaturas: LRC = longitud hocico-cloaca; AC = ancho de la cabeza; LC = longitud de la cabeza; DO = diámetro horizontal del ojo; DIO = distancia interorbital; DON = distancia ojo-fosa nasal; AP = ancho del párpado; DT = diámetro timpánico; LT = longitud de la tibia; LF = longitud del fémur; LP = longitud del pie; LM = longitud de la mano; IIIDM = ancho del disco del dedo III; IVDP = ancho del disco del dedo IV.

Las manchas en las superficies ventrales en hembras son negras y café claro en machos. Las hembras presentan una coloración dorsal negra o café oscuro, mientras que los machos presentan un dorso café anaranjado con manchas en forma de W café

oscuro y V invertida en la nuca.

En preservado (Figura 6), el patrón de coloración dorsal varía desde un dorso homogéneamente negro, gris claro hasta café grisáceo con una barra interorbital crema.

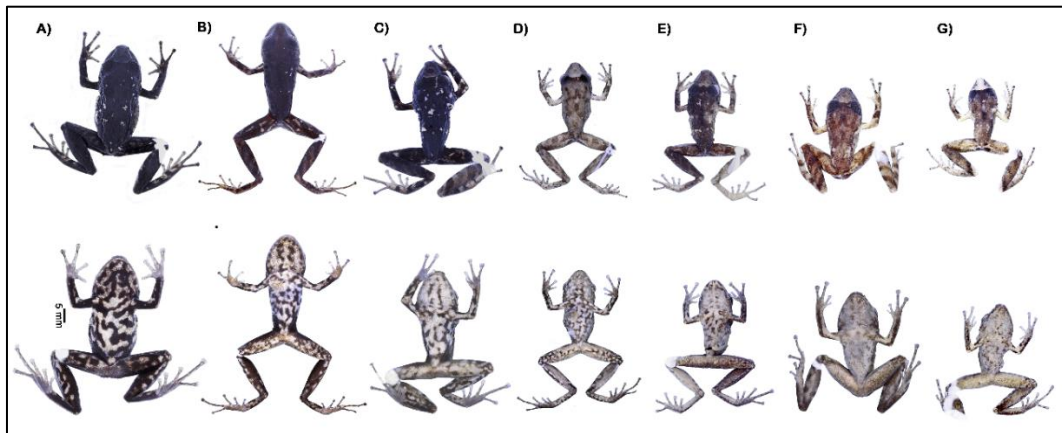


Figura 6. Variación de coloración dorsal y ventral en preservado correspondiente a la serie tipo de *P. paganus* sp. nov.

Fotografías: MYM – HMOA.

La numeración de las columnas se presenta de izquierda a derecha. DHMECN 16810, hembra, holotipo, LRC = 27.23 mm (A). DHMECN 15606, hembra, paratipo, LRC = 29.8 (B). DHMECN 16811, hembra, paratipo, LRC = 24.84 (C). DHMECN 15605, macho, paratipo, LRC = 21.44 (D). DHMECN 16812, macho, paratipo, LRC = 20.24 (E). DHMECN 16813, macho, paratipo, LRC = 17.20 (F). DHMECN 16814, macho, paratipo, LRC = 19.07 (G).

La coloración ventral difiere en la intensidad y abundancia de las manchas, las hembras tienen manchas negras y en los machos esta coloración varía desde café claro, café grisáceo hasta café oscuro. En particular, los muslos y la garganta, presentan una coloración crema grisácea con manchas grandes, negras en las hembras, café oscuro en los machos, y en ambos, manchas café grisáceo, muy pequeñas. El 30% de la serie tipo, carece de manchas grandes y presenta pequeñas manchas de color café grisáceo.

Etimología

El epíteto específico proviene de la palabra latina “*paganus*”, adjetivo derivado de “*pagus*”, que refiere a los habitantes del bosque o aldea, alejados de la civilización y poblados, haciendo referencia a los sitios remotos e inexplorados donde esta especie se distribuye, en los bosques montanos de la Reserva Biológica Colonso Chalupas, Napo, Ecuador.

Distribución e historia natural

Pristimantis paganus sp. nov. se ha registrado en dos localidades separadas por aproximadamente 50 km, localizadas al noreste del Ecuador en las provincias de Napo (Cordillera de Guacamayos, Reserva Biológica Colonso Chalupas) y Pastaza (Cerro de Abitagua, Parque Nacional Llanganates) (Figura 7).

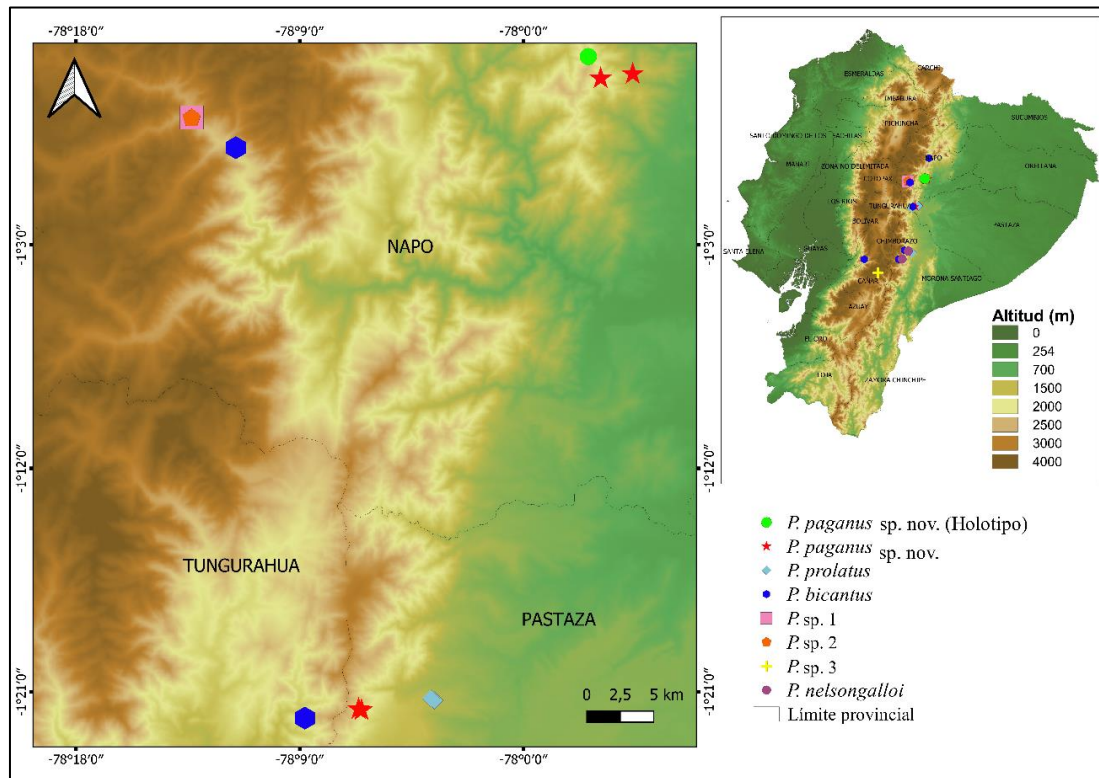


Figura 7. Mapa de Ecuador con la distribución de *Pristimantis paganus* sp. nov., *P. prolatus*, *P. bicantus*, *P. sp. 1*, *P. sp. 2*, *P. sp. 3* y *P. nelsongalloi*.

Las localidades pertenecen al Bosque siempreverde montano del Norte de la Cordillera Oriental de los Andes [37]. Los sitios de colecta se caracterizan por presentar abundantes plantas epífitas (bromelias, helechos y musgo), típicas del bosque nublado Amazónico (Figura 8). La serie tipo de la nueva especie fue colectada en horario nocturno entre 22:00 y 1:00 am, sobre hojas de bromelias entre los 20 – 110 cm de altura. El holotipo, una hembra grávida adulta, fue registrada en la noche del 21 de noviembre del 2021.

Estado de conservación

Durante los muestreos realizados en octubre 2016, Julio 2017 y noviembre 2021, los especímenes colectados de *Pristimantis paganus* sp. nov. fueron registrados de manera

infrecuente (<25 individuos). Sin embargo, esta especie se encuentra asociada a las dos áreas protegidas Reserva Biológica Colonso Chalupas y Parque Nacional Llanganates, en los flancos nor-orientales de los Andes Amazónicos de Ecuador. A pesar de que las poblaciones viables (machos, hembras y juveniles) de esta especie se han encontrado dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), la región donde se distribuye pudiera estar amenazada por minería ilegal, deforestación y cambio climático [19]. De acuerdo a los criterios de Lista Roja de la UICN [38], se propone esta especie como “Casi Amenazada” (NT, por sus siglas en inglés) ya que sus poblaciones no se encuentran en peligro pero en un futuro cercano podrían estarlo.

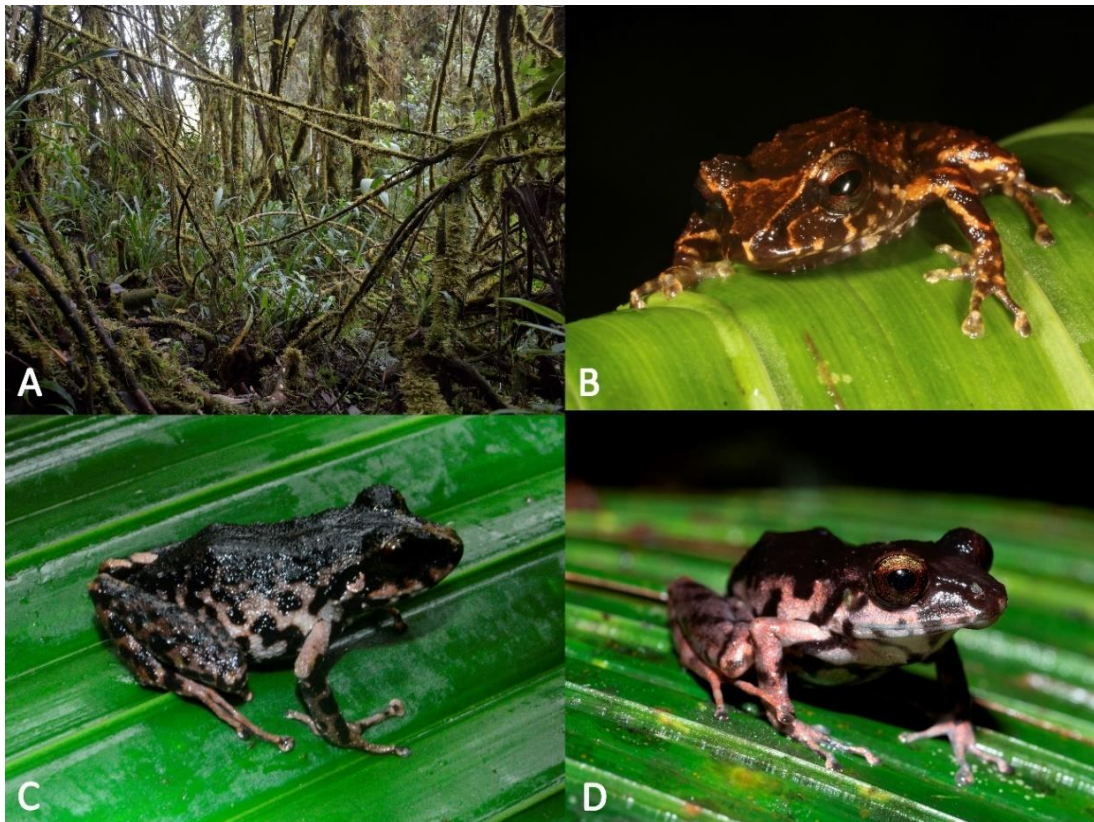


Figura 8. Hábitat y especímenes de *Pristimantis paganus* sp. nov.

Fotografías: HMOA – MYM - Zane Libke.

(A) Bosque de niebla con plantas epífitas, localidad tipo, Reserva Biológica Colonso Chalupas; (B) Paratipo, macho, DHMECN 15602; (C) Holotipo, hembra adulta, DHMECN 16810; (D) Paratipo, hembra adulta, DHMECN 17222.

DISCUSIÓN

La integración de líneas de evidencia molecular y morfológica demuestran que *Pristimantis paganus* sp. nov. es una especie no descrita en el grupo de ranas de desarrollo directo [39]. De acuerdo a la reconstrucción filogenética, *P. paganus* sp. nov. aparece como especie hermana de *Pristimantis* sp. 1 dentro de un clado que incluye además a *P. bicantus*, *P. sacharuna*, *P. nelsongalloi*, *P. sp. 2*, *P. sp. 3* y *P. prolatus* [17], (Figura 1). Las distancias genéticas y la posición filogenética, en combinación con sus caracteres morfológicos, determinan los límites de esta especie respecto a sus congéneres (Figura 1, Tabla 1-2). La distancia encontrada es congruente con lo propuesto por Vieites et al. [40], donde una especie que posee diferencias morfológicas claras y divergencias genéticas altas con respecto a sus especies hermanas más cercanas se estima que se trata de una especie candidata confirmada y con la filogenia publicada por Ortega et al. [17], se demuestra varias especies crípticas asociadas al complejo de *Pristimantis prolatus*.

Se diagnostica al clado como el grupo *Pristimantis prolatus* por ser la especie más antiguamente descrita y poseer mayor soporte filogenético dentro del clado (Figura 1). Las especies pertenecientes a este grupo se caracterizan por poseer una mancha negra ótica detrás del tímpano y por carecer membranas interdigitales y cresta craneal. Además, se encuentran distribuidas en las estribaciones orientales de Ecuador, cuya especiación se hipotetiza por alopatría, al quedar aisladas por la Cordillera Real Amazónica hacia las estribaciones de la cordillera de Abitagua y Guacamayos, y los grandes ríos Amazónicos, p.ej. Napo, Pastaza (Figura 7)[41].

P. paganus sp. nov. se distingue claramente de otros miembros del género *Pristimantis* por su llamativa coloración dorsal, tamaño y discos truncados. Se observa dimorfismo sexual entre machos y hembras de la nueva especie, el cual se expresa por coloración y tamaño corporal con un LRC mayor en hembras (machos LRC 17.20–21.5 mm, media = 19.59 - hembras LRC 24.84–29.8 mm, media = 29.56 mm), como se evidencia en el 90% de especies de Anuros [42]. Cabe mencionar que, dentro del grupo se evidencia únicamente en *P. paganus* sp. nov. variación de coloración entre machos y hembras (Figura 1, Tabla 2) [1]. La saturación opaca de las manchas ventrales en machos, serían resultado de las elevadas concentraciones de testosterona, por esta razón los machos juveniles carecen de este carácter [43].

CONCLUSIONES

Las diferentes líneas de evidencia filogenética, morfológica y biogeográfica demuestran que la posición de *P. paganus* sp. nov. está relacionada con el clado de *Pristimantis prolatus*, siendo endémica para las estribaciones Andinas nor-orientales de Ecuador. Se recomienda realizar un estudio más profundo del clado, dado que existen especies con complejidad taxonómica dentro del mismo. Finalmente, el descubrimiento de esta nueva especie aporta nuevas razones para la conservación de esta región y destaca la importancia de una investigación continua en la reserva, ya que, al ser un área poco explorada, se estima que alberga un sinnúmero de especies sin documentar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Andrea Carrera por su apoyo en el trabajo de laboratorio para la generación de datos moleculares, y a Zane Libke, por permitir utilizar sus datos y fotografías en este estudio. Este trabajo fue apoyado por el proyecto “On the quest of the golden fleece in Amazonia: The first herpetological DNA - barcoding expedition to unexplored areas on the Napo watershed, Ecuador” con una beca de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología del Ecuador (Senescyt-ENSAMBLE Grant #PIC-17-BENS-001) y The World Academy of Sciences (TWAS Grant #16-095) otorgados a HMOA.

LITERATURA CITADA

1. Ron S, Merino A, Ortiz D. Anfibios del Ecuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador 2022 [cited 2023 13 de Enero]. Available from: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>
2. Hedges SB, Duellman WE, Heinicke MP. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*. 2008;1737(1):1–182.
3. Ortega HM, Rodes M, Cisneros DF, et al. Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PloS one*. 2021;16(5).
4. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*. 2007;22(3):148-155.
5. Brito J, Almendáriz A. Una especie nueva de rana *Pristimantis* (Amphibia: Strabomantidae) de ojos rojos de la Cordillera de Cóndor, Ecuador. *Cuadernos de herpetología*. 2018;32(1):31-40.
6. Brito J, Pozo G. Una nueva especie de rana terrestre del género *Pristimantis* (Amphibia: Craugastoridae), de la Cordillera de Kutukú, Ecuador. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 2013;53:315-325.
7. Reyes JP, Yáñez MH. Una nueva especie de *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) del corredor ecológico Ilangantes-sangay, Andes de Ecuador. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 2012;52:81-91.
8. Yáñez M, Meza P, Cisneros D, et al. Descripción de tres nuevas especies de ranas del género *Pristimantis* (Anura: Terrarana: Strabomantidae) de los bosques nublados del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*. 2010;2(3).
9. Acevedo A, Pallares RF, Perez KS. Nuevos registros de especies del género *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) para el nororiente de Colombia. *Revista Biodiversidad Neotropical*. 2014;4(2):162-169.
10. Acosta A. Una nueva especie del género *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) del complejo de páramos Merchán-Iguaque (Boyacá, Colombia). *Biota Colombiana*. 2015;16(2).
11. Lehr E, Coloma LA. A minute new ecuadorian Andean frog (Anura: Strabomantidae, *Pristimantis*). *Herpetologica*. 2008;64(3):354-367.
12. Maciel N, Vaz W, De Oliveira R, et al. A new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from the Brazilian Cerrado. *Zootaxa*. 2012;3265(1):43-56.
13. Reyes JP, Reyes CP, Pérez MB, et al. Dos nuevas especies de ranas *Pristimantis* (Craugastoridae) de la cordillera de los Sacha Llanganatis, vertiente oriental de los Andes de Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*. 2015;7(2).

14. Yanez M. Descripción y relaciones filogenéticas de dos nuevas especies de *Pristimantis* crestadas (Anura: Terrarana: Craugastoridae) de los Andes Norte de Ecuador: PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR. 2014
15. Domínguez O, Vázquez E. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*. 2009;32(1):59-70.
16. Guayasamin JM, Funk WC. The amphibian community at Yanayacu Biological Station, Ecuador, with a comparison of vertical microhabitat use among *Pristimantis* species and the description of a new species of the *Pristimantis myersi* group. *Zootaxa*. 2009;2220(2009):41-66.
17. Ortega JA, Brito J, Ron SR. Six new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from Llanganates National Park and Sangay National Park in Amazonian cloud forests of Ecuador. *PeerJ*. 2022;10:e13761.
18. Álvarez S, Tirira D, Peñuela M, editors. Reserva Biológica Colonso-Chalupas: ¿límite regional en primates del Ecuador. Libro de Resúmenes I Congreso Nacional de Manejo de Vida Silvestre y III Congreso Ecuatoriano de Mastozoología; 2016; Santa Elena, Ecuador: Ministerio del Ambiente del Ecuador y Asociación Ecuatoriana de Mastozoología.
19. Paz A. Ecuador: la minería avanza aceleradamente en la provincia de Napo y llega hasta tres de sus áreas protegidas. 2022 [cited 2023] Enero 12]. Available from: <https://es.mongabay.com/2022/08/mineria-avanza-aceleradamente-en-la-provincia-de-napo-en-ecuador/>
20. Rice KG, Mazzotti FJ, Waddle JH, et al. Uso de Anfibios como Indicadores del Éxito de la Restauración de Ecosistemas. Universidad de la Florida Wildlife Ecology and Conservation. 2006.
21. Heyer R, Donnelly MA, Foster M, et al. Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution; 2014.
22. Sabaj M. Códigos simbólicos estándar para colecciones de recursos institucionales en herpetología y ictiología: una referencia en línea. *Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos. Copeia* 2016;108(3): 593-669.
23. Lehr E, Duellman WE. Terrestrial-breeding frogs (Strabomantidae) in Peru. Nature und Tier Verlag; 2009.
24. Vences M, Thomas M, Van der Meijden A, et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool*. 2005 Mar 16;2(1):5.
25. Palumbi SR, Metz EC. Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*). *Molecular Biology and Evolution*. 1991;8(2):227-239.
26. Heinicke MP, Duellman WE, Hedges SB. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(24):10092-10097.

27. Meyer CP, Geller JB, Paulay G. Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution*. 2005;59(1):113-125.
28. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-1649.
29. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013 Apr;30(4):772-80.
30. Maddison WP, Maddison DR. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. Version 3.61. 2019. Available from: <http://mesquiteproject.org>
31. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015 Jan;32(1):268-74.
32. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 2017 2017/06/01;14(6):587-589.
33. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*. 2010;59(3):307-321.
34. Minh BQ, Nguyen MAT, Von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(5):1188-1195.
35. Rambaut A. FigTree version 1.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2006-2012. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
36. Valencia JH, Valladares F, Tipantiza L, et al. A new species of terrestrial-breeding frog of the genus *Pristimantis* (Anura: Terrarana: Craugastoridae) from the eastern Andean slopes of the southern Ecuador. *Zootaxa*. 2019;4658(3).
37. Galeas R, Guevara J, Medina B, et al. Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2013.
38. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2 2023 [cited 2023 13 de Enero]. Available from: <https://www.iucnredlist.org>
39. Padial JM, Grant T, Frost DR. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*. 2014;3825(1):1–132.
40. Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, et al. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 19;106(20):8267-72.
41. Duarte A. Los Andes como fuente de especiación, una evidencia con ranas de lluvia del género

Pristimantis. 2013.

42. Vitt LJ, Caldwell JP. Herpetology, An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Vol. Fourth Edition. University of Oklahoma, Norman, Oklahoma 2014.
43. Tolosa Y, Molina C, Restrepo A, et al. Sexual maturity and sexual dimorphism in a population of the rocket-frog *Colostethus aff. fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae) on the northeastern Cordillera Central of Colombia. 2014;37(102, 2014).

ANEXOS

Tabla 1. Números de acceso de Genbank correspondientes únicamente a las especies del clado al que pertenece *P. paganus* sp. nov. *Secuencias por subir a Genbank.

Voucher	Especies	12 S	16 S	RAG 1
DHMECN 15588	<i>P. paganus</i> sp. nov.	*	*	*
DHMECN 15589	<i>P. paganus</i> sp. nov.	*	*	*
DHMECN 15590	<i>P. paganus</i> sp. nov.	*	*	*
DHMECN 15591	<i>P. paganus</i> sp. nov.	*	*	*
QCAZ 16186	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241483	MZ560969
QCAZ 31985	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241487	MZ560970
QCAZ 31986	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241488	-
QCAZ 31988	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241489	MZ560971
QCAZ 46184	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241504	MZ560972
QCAZ 52489	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241507	MZ241507
QCAZ 56440	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241513	MZ560974
QCAZ 58972	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MZ241516	MZ560975
QCAZ58597	<i>Pristimantis bicantus</i>	-		MK829658
QCAZ 58592	<i>Pristimantis bicantus</i>	-	MK829657	-
QCAZ 31860	<i>Pristimantis nelsongalloi</i>	-	MZ241485	MZ560976
QCAZ 31861	<i>Pristimantis nelsongalloi</i>	-	MZ241486	MZ560978
QCAZ 59202	<i>Pristimantis nelsongalloi</i>	MZ330733	MZ241517	-
QCAZ 59211	<i>Pristimantis nelsongalloi</i>	-	MZ241518	-
QCAZ 52496	<i>Pristimantis sacharuna</i>	-	MZ241508	MZ241508
QCAZ 52515	<i>Pristimantis prolatus</i>	-	MZ241509	MZ560979
QCAZ 58963	<i>Pristimantis prolatus</i>	-	MZ241515	MZ560980
QCAZ 59480	<i>Pristimantis prolatus</i>	-	MZ241519	-
QCAZ 59586	<i>Pristimantis prolatus</i>	-	MZ241523	MZ560977
QCAZ 59603	<i>Pristimantis prolatus</i>	-	MZ241524	MZ560981
QCAZ 46223	<i>Pristimantis</i> sp. 1	-	MZ241505	MZ560982
QCAZ 70020	<i>Pristimantis</i> sp. 1	-	MZ241536	-
QCAZ 69791	<i>Pristimantis</i> sp. 2	-	MZ241535	-
QCAZ 51553	<i>Pristimantis</i> sp. 3	-	MZ241506	MZ560973

Elaborado por: Loza, Keyko, 2023.

Figura 7. Filogenia completa del género *Pristimantis*.

https://drive.google.com/drive/u/1/folders/1PYAqO9lwRwgl-QcP_hQaH6mdtKlZPcTL