

GENÉTICA, BIOACÚSTICA Y MORFOLOGÍA REVELAN UNA NUEVA ESPECIE OCULTA EN *PRISTIMANTIS DORSOPICTUS* (ANURA: STRABOMANTIDAE)

GENETICS, BIOACOUSTICS, AND MORPHOLOGY REVEAL A NEW HIDDEN SPECIES IN *PRISTIMANTIS DORSOPICTUS* (ANURA: STRABOMANTIDAE)

ELIZA PATIÑO-OCAMPO¹, SEBASTIÁN DUARTE-MARÍN² & MAURICIO RIVERA-CORREA^{1,3,4,*}

¹Semillero de Investigación en Biodiversidad de Anfibios (BIO), Seccional Oriente, Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.

²Grupo Evolución, Ecología y Conservación (EECO), Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

³Grupo Herpetológico de Antioquia (GHA), Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁴Laboratorio de Anfibios, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

*Correspondence: mauriciorivera79@gmail.com

Received: 2021-06-15. Accepted: 2021-11-29. Published: 2022-02-03.

Editor: Katyuscia Araujo-Vieira, Brasil.

Abstract.— The phenotypic variation of some species at the geographic level makes them excellent models to evaluate different evolutionary attributes and answer questions related to their diversity. In addition, the constant effort of sampling in high Andean ecosystems that include the type localities of the species, and the integration of a novel data set can lead to unsuspected taxonomic findings. In this study we provide genetic, bioacoustics and morphological evidence to support the delimitation, and description of a new species from the northern Andean forests, historically confused with *Pristimantis dorsopictus* (Rivero & Serna, 1988). The latter and the new species were not recovered as sister lineages in our phylogenetic analyses, and although they are relatively similar, both differ phenotypically in body size, coloration pattern, skin texture, call duration and dominant frequency, among other attributes. Our phylogenetic inference suggests that the new species is part of the *P. boulengeri* group and was recovered as sister to the clade that includes *P. urani*, *P. angustilineatus*, *P. boulengeri*, *P. brevifrons*, and *P. dorsopictus*. The results suggest that advertisement calls constitute an important source of information for understanding the acoustic diversity of the *P. boulengeri* group and for delimiting the species of the genus *Pristimantis*, which despite its great diversity, presents a limited acoustic knowledge in those with distribution in Colombia.

Keywords.— Andes, cryptic diversity, haplotype network, geography, phylogenetics.

Resumen.— La variación fenotípica de algunas especies a nivel geográfico, las convierte en excelentes modelos para evaluar los diferentes atributos evolutivos y responder preguntas relacionadas con su diversidad. Sumado a ello, el constante esfuerzo de muestreo en ecosistemas altoandinos que incluyan las localidades tipo de las especies y la integración de un novedoso conjunto de datos, puede conducir a hallazgos taxonómicos insospechados. En este estudio proporcionamos evidencia genética, bioacústica y morfológica para soportar la delimitación y descripción de una nueva especie de los bosques al norte de los Andes, históricamente confundida con *Pristimantis dorsopictus* (Rivero & Serna, 1988). Esta última y la nueva especie no fueron recuperadas como linajes hermanos en nuestros análisis filogenéticos, y aunque son relativamente similares, ambas se diferencian fenotípicamente en tamaño corporal, patrón de coloración, textura de piel, duración del canto y frecuencia dominante, entre otros atributos. Nuestra inferencia filogenética sugiere que la nueva especie es parte del grupo *P. boulengeri*, y fue recuperada como hermana del clado que incluye a *P. urani*, *P. angustilineatus*, *P. boulengeri*, *P. brevifrons* y *P. dorsopictus*. Los resultados sugieren que los cantos de anuncio constituyen una

fueron de información importante para comprender la diversidad acústica del grupo de *P. boulengeri* y para la delimitar la especies del género *Pristimantis*, que a pesar su gran diversidad, presenta un limitado conocimiento acústico en aquellas con distribución en Colombia.

Palabras clave.— Andes, diversidad críptica, filogenética, geografía, red de haplotipos.

INTRODUCCIÓN

La superfamilia de anfibios Brachycephaloidea Günther, 1858, comúnmente conocida como el clado Terrarana (Hedges et al., 2008), es la radiación de tetrápodos terrestres más diverso del mundo (Padial et al., 2014), conteniendo en la actualidad aproximadamente 1200 especies formalmente descritas (Frost, 2021). Se ha sugerido que todos los miembros de este grupo depositan sus huevos en hábitats terrestres y los embriones cumplen todo su estadio larval dentro del huevo, sin pasar por la etapa de renacuajo, atributo reproductivo conocido como desarrollo directo (Duellman & Trueb, 1994; Wells, 2007; Hedges et al., 2008; Padial et al., 2014).

Pristimantis (Strabomantidae, Hedges et al., 2008) es el género más diverso de Brachycephaloidea y comprende casi la mitad de las especies conocidas de la superfamilia (575 especies; Frost, 2021). Es así como en los últimos 10 años (i.e. 2011–2020) se describieron 120 especies (12 especies por año, AmphibiaWeb, 2021) principalmente en Ecuador y Colombia, los dos países con mayor biodiversidad en el género, con 238 y 234 especies respectivamente (Acosta-Galvis, 2021; Ron et al., 2021). Este número continúa incrementando constantemente, en parte por la integración cada vez más frecuente de herramientas moleculares (principalmente secuenciación de genes mitocondriales) aplicadas en inferencias filogenéticas y evidencia bioacústica la cual contribuye a comprender la variación fenotípica más allá de la morfología tradicional (e.g. Hutter & Guayasamin, 2015; Páez & Ron, 2019; Rivera-Correa & Daza, 2020).

Los estudios basados en la integración de diferentes líneas de evidencia han permitido el reconocimiento de diversidad críptica a nivel de especies y la existencia de complejos de especies, es decir, dos o más entidades evolutivas independientes que históricamente han sido clasificadas bajo un solo nombre (Bickford et al., 2007; Padial & De la Riva, 2009; Padial et al., 2010). Esto posiblemente como consecuencia de una morfología convergente, por la ausencia de un adecuado análisis del conjunto de datos, o inclusive, por la limitación operativa de detectar las diferencias cuando estas existen.

Pristimantis dorsopictus (Rivero & Serna, 1988) es una especie que exhibe una alta variación intraespecífica en su coloración (Fig. 1). Fue descrita en los bosques de niebla a 2800 m s.n.m. (sobre el nivel del mar) de la Cordillera Central, entre los límites de los municipios de Sonsón y Nariño, zona de amortiguamiento del Páramo de Sonsón, departamento de Antioquia, Colombia. La distribución geográfica de esta especie es relativamente amplia (Marín et al., 2021) y comprende elevaciones entre los 2200 y 3150 m s.n.m, en los departamentos de Antioquia y Caldas (base de datos: MHUA 2021; Apéndice 1). De acuerdo con Rivera-Correa y Daza (2016), *P. dorsopictus* está estrechamente relacionada con *P. boulengeri* (Lynch, 1981), *P. urani* Rivera-Correa y Daza, 2016 y *P. brevifrons* (Lynch, 1981) y hace parte del grupo de especies *P. boulengeri*, endémico de Colombia y formalmente reconocido por González-Durán et. al (2017); este grupo contiene además a *P. angustilineatus* (Lynch, 1998), *P. baiotis* (Lynch, 1998), *P. myops* (Lynch, 1998) y *P. quantus* (Lynch, 1998).

A pesar de que *Pristimantis dorsopictus* es una especie relativamente abundante en el norte de la Cordillera Central en Antioquia y que exhibe una amplia variación de patrones de coloración dorsal, otros rasgos fenotípicos como las vocalizaciones y su morfometría no han sido previamente evaluados. Además, las hipótesis filogenéticas previas (Rivera-Correa & Daza, 2016), no han incluido especímenes de la localidad tipo. Dado lo anterior y la fácil detección en los bosques altoandinos, convierten a *P. dorsopictus* en una excelente candidata para elucidar los límites de su diversidad genética, bioacústica y morfológica a lo largo de su distribución geográfica.

Considerando esto, en esta investigación nos trazamos cinco objetivos: (1) evaluar la divergencia genética en dos marcadores mitocondriales (COI y 16S) ampliamente utilizados en sistemática de anuros; (2) establecer la posición filogenética de especímenes de nuevas localidades, incluyendo la localidad tipo; (3) evaluar patrones espectrales y temporales de los cantos de anuncio a lo largo de su distribución; (4) evaluar la variabilidad morfométrica en un contexto multivariado y finalmente, (5) evaluar si existe evidencia que sugiera que *P. dorsopictus* representa un caso de diversidad críptica.

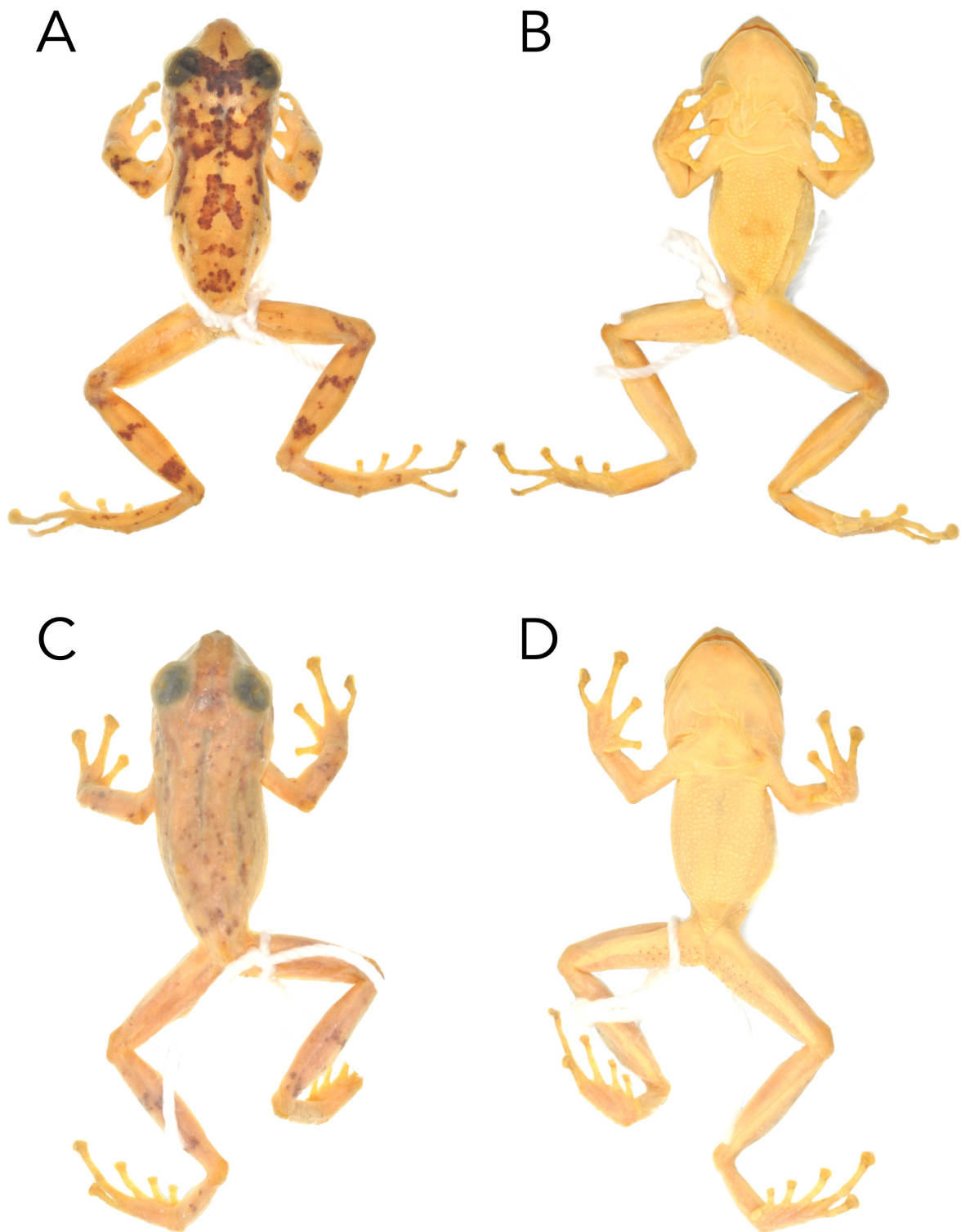


Figure 1. Paratypes of *Pristimantis dorsopictus*. (A) Dorsal view; (B) ventral view (CSJ-h 4888, LRC 19.15 mm); (C) dorsal view; (D) ventral view (CSJ-h 4876, LRC 19.67 mm).

Figura 1. Paratipos de *Pristimantis dorsopictus*. (A) Vista dorsal; (B) vista ventral (CSJ-h 4888, LRC 19.15 mm); (C) vista dorsal; (D) vista ventral (CSJ-h 4876, LRC 19.67 mm).

MATERIALES Y MÉTODOS

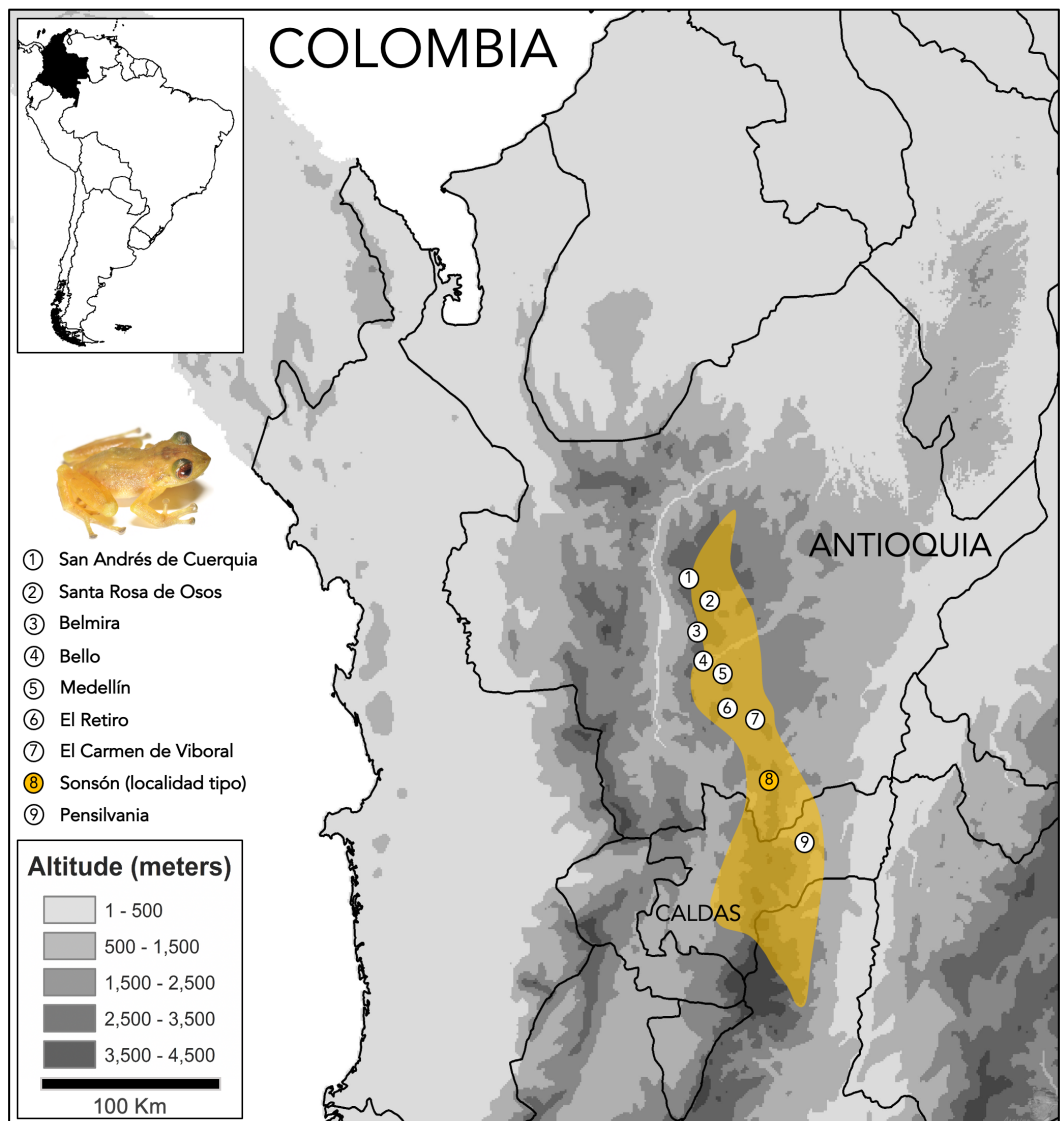
Fase de campo. Entre junio de 2010 y marzo 2021 realizamos 10 salidas de campo y obtuvimos muestras de diferentes localidades entre 2600–2900 m s.n.m. en los departamentos de Antioquia y de Caldas en Colombia. En todas estas localidades *Pristimantis dorsopictus* ha sido previamente documentada, incluyendo Sonsón, Antioquia, su localidad tipo (Fig. 2; Apéndice 1). Registramos localidades, coordenadas y elevaciones utilizando un GPS Garmin 60Cx, georreferencias validadas en GoogleEarth. Colectamos 30 individuos, los sacrificamos con lidocaína al 2 %, fijamos en etanol al 80 % y preservamos en etanol al 70 %. Antes de la fijación, extrajimos muestras de tejido de las extremidades

posteriores de algunos especímenes y las conservamos en etanol al 95 % para los estudios genéticos.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN. Amplificamos y secuenciamos dos fragmentos de genes mitocondriales de 31 especímenes, 14 de ellos pertenecientes a *Pristimantis dorsopictus*. Extrajimos el ADN genómico total del músculo utilizando el kit de purificación de ADN genómico GeneJET (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Amplificamos un fragmento del gen ribosómico 16S usando los cebadores 16SCL-16SDH (Santos et al., 2003) y un fragmento de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa usando los cebadores dgLCO y dgHCO (Folmer et al., 1994). La amplificación por PCR se llevó a cabo en reacciones de 30 ml utilizando perlas

Figure 2. Geographic distribution of *Pristimantis dorsopictus* in the north of the Central Cordillera in the department of Antioquia and Caldas, Colombia between 2250 and 3100 m a.s.l. In yellow distribution extent inferred from the IUCN Red List. For more information on localities and coordinates (Appendix 1).

Figura 2. Distribución geográfica de *Pristimantis dorsopictus* en el norte de la cordillera Central en el departamento de Antioquia y Caldas, Colombia entre los 2250 y 3100 m s.n.m. En amarillo extensión de la distribución inferida a partir de la Lista Roja de IUCN. Para ampliación de los datos de localidades y coordenadas (Apéndice 1).



puReTaq Ready-To-Go (Amersham Biosciences). Posteriormente, enviamos productos de PCR a Macrogen (Macrogen, Inc., Corea) para su secuenciación. Verificamos y editamos los cromatogramas manualmente usando Geneious 9.1.8 (creado por Biomatters y disponible en <http://www.geneious.com>), posteriormente realizamos comparaciones rápidas con el banco de genes (NCBI, 1988; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para descartar errores en las secuencias. Los números de acceso de Genbank para las secuencias nuevas generadas en este estudio, se proporcionan en el Apéndice 2.

Análisis filogenético. Para construir nuestro conjunto de datos moleculares, tuvimos en cuenta especies incluidas en trabajos previos (i.e. Rivera-Correa & Daza, 2016; González-Durán et al., 2017; Rivera-Correa et al., 2017), a esta matriz agregamos representantes de especies filogenéticamente cercanas a *Pristimantis dorsopictus* (según los resultados preliminares al realizar un Blast; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La matriz incluyó 134 terminales que representan 55 especies nominales dentro de *Pristimantis*. Usamos a *Craugastor metriosistus* como raíz (Apéndice 2). Utilizamos el método G-INS-i en MAFFT v7 (Katoh & Standley, 2013) para alinear las matrices de datos moleculares. El conjunto de datos completo comprendió 1469 sitios alineados: 840 sitios de 16S y 630 de COI. Inferimos el mejor esquema de partición y modelo de evolución para cada partición utilizando ModelFinder bajo el criterio BIC (Kalyanamoorthy et al., 2017). Inferimos el árbol filogenético más óptimo usando máxima verosimilitud en IQTREE (Nguyen et al., 2015), partir de 10.000 búsquedas independientes con los parámetros por defecto del programa. Adicionalmente, estimamos el soporte de nodos a partir de 10.000 pseudorreplikas de Ultra Fast Bootstrap (UFB; Hoang et al., 2018).

Distancia genética. Calculamos las distancias genéticas (DG) sin corregir entre *Pristimantis dorsopictus* y todas las especies relacionadas pertenecientes al grupo *P. boulengeri* (excepto para *P. baiotis* cuyas secuencias no están disponibles). Para ello, utilizamos MEGA 7 (Tamura et al., 2013) a partir de la comparación de 630 pb del marcador COI y 565 pb del marcador 16S. Para las distancias genéticas entre pares de linajes con monofilia recíproca, seguimos los umbrales de 3 % para 16S (Fouquet et al., 2007) y alrededor de 7 % para COI (Lyra et al., 2017), teniendo en cuenta las limitaciones del uso de umbrales para las decisiones taxonómicas (ver discusión). Adicionalmente para determinar la variación genética de las poblaciones consideradas a priori como *P. dorsopictus*, construimos una red de haplotipos utilizando el método de unión por la mediana (Bandelt et al., 1999) implementado en el programa PopART (Leigh, 2016).

Análisis acústico. Analizamos un total de 797 cantos correspondientes a 34 individuos de seis localidades (ver Apéndice 1). Los registros de audio fueron obtenidos con grabadoras TASCAM DR22, TASCAM DR40 y Marantz PMD661, auxiliadas con un micrófono unidireccional SENNHEISER ME66/K6. Obtuvimos grabaciones complementarias depositadas en el Museo de Herpetología Universidad de Antioquia (MHUA). Las variables espectrales y temporales fueron obtenidas en el software Raven Pro 1.5 (Center for Conservation Bioacoustics, 2014) con una frecuencia de muestreo de 44.1 kHz y 16 bits de resolución. Los espectrogramas fueron construidos usando una ventana de Hann con 90 % de superposición y 512 puntos de resolución para la transformada rápida de Fourier (FFT). Siguiendo a Köhler et al. (2017), medimos los siguientes parámetros acústicos (unidades entre paréntesis): (1) frecuencia dominante (kHz), (2) duración del canto (s), (3) tasa de canto (n° cantos/min), (5) intervalo entre cantos (s), (6) número de armónicos, (7) frecuencia de cada armónico (kHz), (8) ancho de banda (BW 90 %), (9) frecuencia 5 % (kHz) y (10) frecuencia 95 % (kHz); estas dos últimas mediciones incluyen la frecuencia más alta y la frecuencia más baja, ignorando el 5 % superior e inferior sobre la banda de frecuencia formada por la distribución de energía (todo esto para disminuir el sesgo de selección manual de dicha banda). Los espectrogramas y oscilogramas se generaron utilizando el paquete Seewave v 2.1.3 (Sueur et al., 2019) en la versión R 4.0.3 (R Core Team, 2020) siguiendo la terminología descrita en Köhler et al. (2017) para la descripción de los cantos. Nuestra unidad de muestreo para el análisis estadístico fue el macho grabado, es decir, calculamos para cada macho el valor medio de las características del canto y luego calculamos una nueva media $\pm$ desviación estándar, seguida del intervalo de variación (mínimo-máximo) (ver Tabla 1).

Análisis morfológico. Determinamos el sexo y la madurez mediante la evaluación de los caracteres sexuales secundarios. Para machos: presencia de excrescencia nupcial en el dedo I de las manos, hendiduras vocales, expansión del saco vocal y registros en campo de machos vocalizando; para hembras: huevos visibles o mediante observación en el campo de amplexo. Haciendo uso de un calibrador digital (Mitutoyo CD-6" CSX) de 0,01 de precisión, medimos 61 individuos machos (incluidos los paratipos) de cinco localidades distintas (ver Apéndice 1). Consideramos 16 variables morfométricas basados en Watters et al. (2016). Estas medidas corresponden a: (1) longitud rostro-cloaca (LRC); (2) ancho de la cabeza (AC); (3) largo de la cabeza (LC); (4) distancia interocular (DIO); (5) distancia entre narinas (DIN); (6) diámetro del ojo (DO); (7) diámetro del tímpano (DT); (8) distancia ojo-narina (DON); (9) longitud del hocico (LH); (10) longitud del pie (LP); (11) longitud de la tibia (LT); (12) longitud del fémur/muslo (LFM);

Table 1. Descriptive statistics (mean $\pm$ SD, minimum-maximum) and t Student results for the seven bioacoustic characters measured in the calls of specimens corresponding to clades 1 and 2. Statistically significant results ($P < 0.05$) are highlighted in bold.

Tabla 1. Estadística descriptiva (media $\pm$ DE, mínimo-máximo) y resultados t Student para los siete caracteres bioacústicos medidos en los cantos de especímenes correspondientes a los clados 1 y 2. Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

Estadística descriptiva			
	Clado 1 n = 20	Clado 2 n = 14	Resultados t-student
Duración canto/nota (s)	0.10 $\pm$ 0.02 (0.04–0.14)	0.03 $\pm$ 0.01 (0.01–0.04)	t = 12.129 P < 0.001
Ancho de banda 90 % (kHz)	0.29 $\pm$ 0.06 (0.19–0.41)	0.36 $\pm$ 0.08 (0.26–0.50)	t = -3.020 P < 0.05
Frecuencia dominante (kHz)	3.09 $\pm$ 0.12 (2.87–3.27)	5.55 $\pm$ 0.28 (5.25–6.19)	t = -28.745 P < 0.001
Frecuencia 5 % (kHz)	3.09 $\pm$ 0.12 (2.87–3.27)	5.39 $\pm$ 0.28 (5.08–6.03)	t = -29.433 P < 0.001
Frecuencia 95 % (kHz)	3.37 $\pm$ 0.15 (3.10–3.61)	5.77 $\pm$ 0.28 (5.43–6.38)	t = -28.529 P < 0.001
Cantos/min	21.23 $\pm$ 9.51 (8–41)	13.64 $\pm$ 4.86 (6–21)	t = 3.043 P < 0.05
Intervalo silencioso (s)	2.74 $\pm$ 1.32 (0.95–6.05)	3.61 $\pm$ 1.38 (2.51–7.90)	t = -1.846 P = 0.07

(13) longitud de la mano (LM); (14) longitud del antebrazo (LAB); (15) ancho del parpado superior (APS); (16) ancho del disco del dedo IV (ADIV). Para describir el color en vida nos basamos en fotografías digitales. Para la descripción morfológica seguimos a Lynch y Duellman (1997) en tanto que los estados de los caracteres diagnósticos siguen a Duellman y Lehr (2009). En cuanto a la expansión de los discos, tuvimos en cuenta la relación del ancho del disco respecto al ancho del dedo de acuerdo a la codificación de Grant et al. (2006). Siempre que mencionamos un nombre científico, el autor y el año de publicación es citado según la propuesta de Wägele et al. (2011). Comparamos nuestros especímenes con las descripciones originales de especies relacionadas y con especímenes depositados en las siguientes colecciones científicas: Museo de Herpetología de la Universidad de Antioquia (MHUA) en Medellín, Colombia; Museo de Ciencias Naturales de La Salle (CSJ), Medellín, Colombia; Colección de Anfibios del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia (ICN), Bogotá, Colombia; y la Colección de Anfibios y Reptiles de la Universidad del Quindío (ARUQ), Armenia, Colombia (Apéndice 3).

Análisis estadístico. La definición de los grupos para los análisis estadísticos estuvo basada en los resultados de la inferencia filogenética; estos además fueron corroborados con las propiedades de las vocalizaciones. Para las variables acústicas, realizamos análisis univariados, en donde evaluamos la homogeneidad de varianzas y aplicamos una prueba t Student para dos muestras independientes, con el fin de poner a prueba diferencias entre las poblaciones. Para determinar si los efectos del tamaño corporal (LRC) afectaban las diferencias en las propiedades espectrales (frecuencia dominante kHz), se realizó un t Student sobre los residuos de una regresión lineal entre las poblaciones seleccionadas. Realizamos análisis multivariados para determinar si los parámetros acústicos podrían usarse potencialmente para discriminar entre poblaciones (Simões et al., 2008; Padial & De La Riva, 2009; Gambale et al., 2014). Inicialmente usamos los valores medios de los siete parámetros acústicos como variables para el análisis de componentes principales (ACP). Posteriormente consideramos los puntajes generados para cada factor como variables independientes para un análisis de función discriminante (AFD), eliminando posibles auto-correlaciones entre las variables. Los análisis de función discriminante permiten el incumplimiento de supuestos de normalidad y la prueba de significancia resultante continúa con confiabilidad (Tabachnick & Fidell, 1996). Para el análisis de variables morfométricas, se realizó igualmente un ACP con el fin de reducir las dimensiones de las 16 variables, seguido de una t Student para dos muestras independientes, sobre los puntajes generados en el ACP para determinar las diferencias entre poblaciones y un AFD para definir el porcentaje de clasificación predicha por el modelo. Todos los análisis estadísticos los realizamos en el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2020), usando los paquetes factoextra v 1.0.7, MASS v 7.3-53, ggplot2 v 3.3.3.

RESULTADOS

Análisis filogenético. Nuestro análisis resultó en 827 caracteres moleculares invariantes (= 56,3 % de todos los sitios) y 642 posiciones informativas (= 44,7 % de todos los sitios). El mejor esquema resultante fue en cuatro particiones (16S, COIpos1, COIpos2, COIpos3) y los modelos de sustitución nucleotídica para cada uno de estos fueron, los siguientes: 16S: TIM2 + F + R6, COIpos1: TIM3e + G4, COIpos2: TPM3 + F + R2 y COIpos3: TPM3 + F + R2. El árbol de máxima verosimilitud (-lnL = -13800.5, AICc = 28251.1) recuperó un alto soporte en la mayoría de las ramas (Fig. 3). La topología inferida más óptima recuperó al grupo de *Pristimantis boulengeri* como hermano del grupo de *P. leptolophus* (Hedges et al., 2008), con máximo soporte. *Pristimantis dorsopictus* fue recobrada como parte del grupo de *P. boulengeri*, aunque

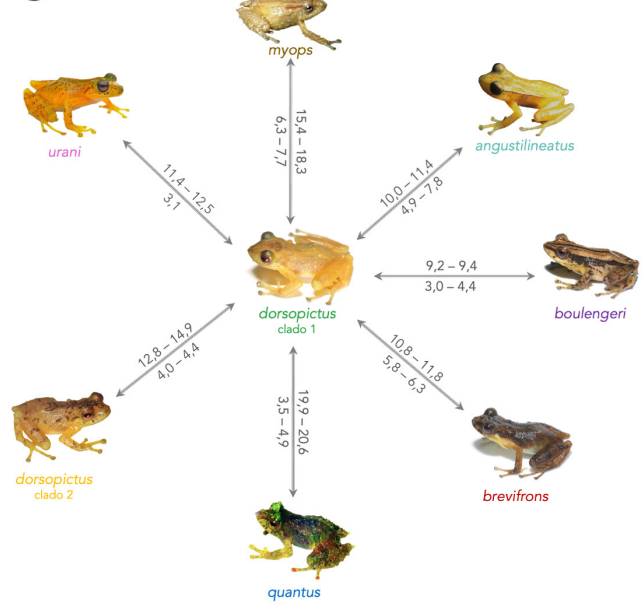
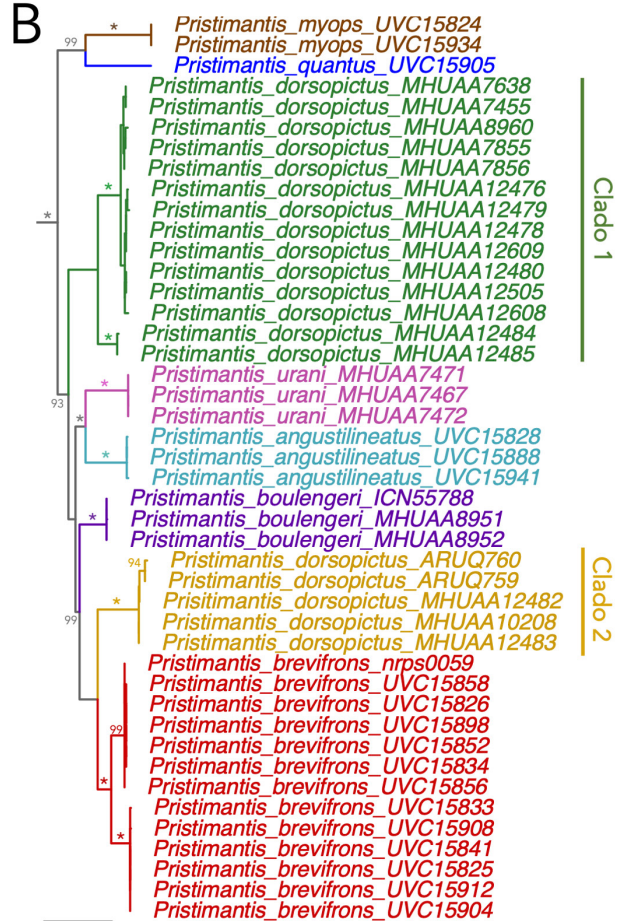
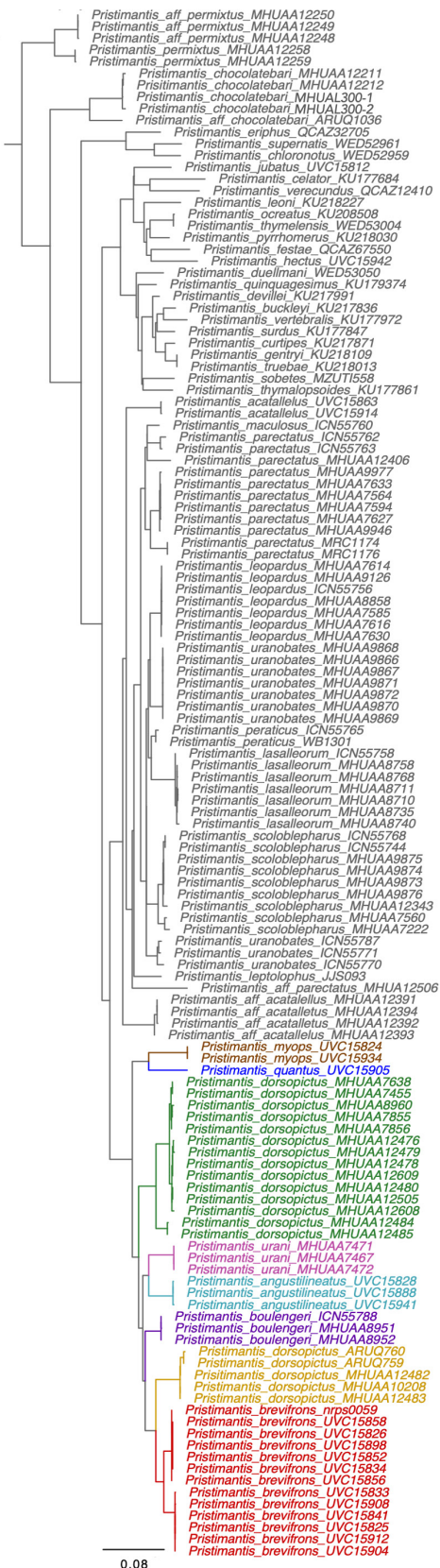


Figure 3 (previous page). (A) Maximum likelihood tree ($-\ln L = -13800.5$) representing the evolutionary relationships of the *Pristimantis boulengeri* group from analyses of 1469 molecular characters (16S and COI), 132 terminals and 55 nominal species; (B) group highlight showing the phylogenetic position of *Pristimantis dorsopictus* and its respective clades (see text); (C) genetic distances (in percentage) of closely related species within the *P. boulengeri* for 630 aligned bases from the COI region (above and to the right of the arrows) and 565 aligned bases from the 16S region (below and to the left of the arrows). The colors of the species names match the phylogeny.

Figura 3 (página anterior). (A) Árbol de máxima verosimilitud ($-\ln L = -13800.5$) representando las relaciones evolutivas del grupo *Pristimantis boulengeri* a partir de análisis de 1469 caracteres moleculares (16S y COI), 132 terminales y 55 especies nominales; (B) destaque del grupo mostrando la posición filogenética de *Pristimantis dorsopictus* y sus respectivos clados (ver texto); (C) distancias genéticas (en porcentaje) de las especies estrechamente relacionadas al interior del grupo *P. boulengeri* para 630 bases alineadas de la región COI (sobre y a la derecha de las flechas) y 565 bases alineadas de la región 16S (debajo y a la izquierda de las flechas). Los colores de los nombres de las especies coinciden con la filogenia.

destacamos no fue recuperada como una especie monofilética. En primer lugar, dos especímenes (MHUA-A 12480 y MHUA-A 12505), de la localidad tipo, Sonsón, se agrupan con individuos de los municipios de Bello, Belmira, El Carmen de Viboral y Medellín y todos ellos a un subclado de dos terminales de San Andrés de Cuerquia moderadamente divergente (MHUA-A 12484 y MHUA-A 12485), ellos formando un clado (Clado 1). Este Clado 1 es externo a todos los demás miembros del grupo de *P. boulengeri* excepto *P. myops* y *P. quantus*. En segundo lugar, tres especímenes de la localidad tipo (MHUA-A 10208, MHUA-A 12482 y MHUA-A 12483) y dos especímenes de Pensilvania, Caldas (ARUQ759 y ARUQ760) constituyen el Clado 2, recuperado como hermano de *P. brevifrons* (Fig. 3B).

Distancia genética. Las distancias genéticas no corregidas para *Pristimantis dorsopictus* al interior del Clado 1 fueron de 0,0 a 2,2 % para 16S (total = 13 individuos) y de 0,0 a 6,6 % para COI (total = 9 individuos). La divergencia genética entre los individuos del Clado 1 y Clado 2 fue de 4,0 a 4,4 % para 16S de 12,8 a 14,9% para el marcador COI. Adicionalmente, individuos del Clado 2 e individuos de *P. brevifrons*, su especie hermana, presentaron divergencias de 5,8 a 6,3% y 7,3 a 9,1% para 16S y COI respectivamente (Fig. 3C; Apéndices 4–5).

Análisis acústico. Los promedios de las variables acústicas de cada individuo se agregaron en dos grupos, congruentes con el Clado 1 y Clado 2 recuperados en nuestra filogenia (Fig. 4). El canto de anuncio de los dos clados evaluados está compuesto de una sola nota pulsátil, sin distinción entre pulsos, sin

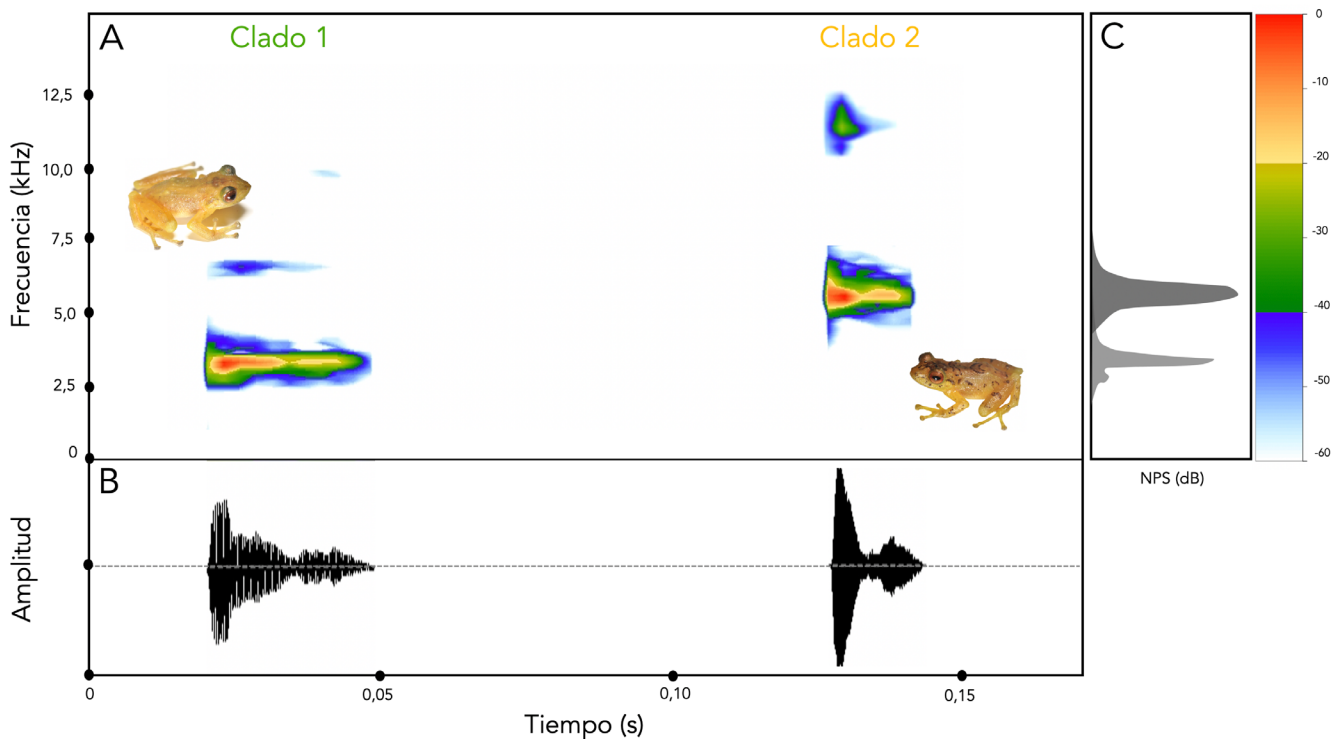


Figure 4. Representation of *Pristimantis dorsopictus* advertisement calls. Clade 1: MHUA-A 12478 Clade 2: MHUA-A 12492. (A) Spectrogram; (B) oscillogram; (C) power spectrum.

Figura 4. Representación de los cantos de anuncio de *Pristimantis dorsopictus*. Clado 1: MHUA-A 12478 Clado 2: MHUA-A 12492. (A) Espectrograma; (B) oscillograma; (C) espectro de potencia.

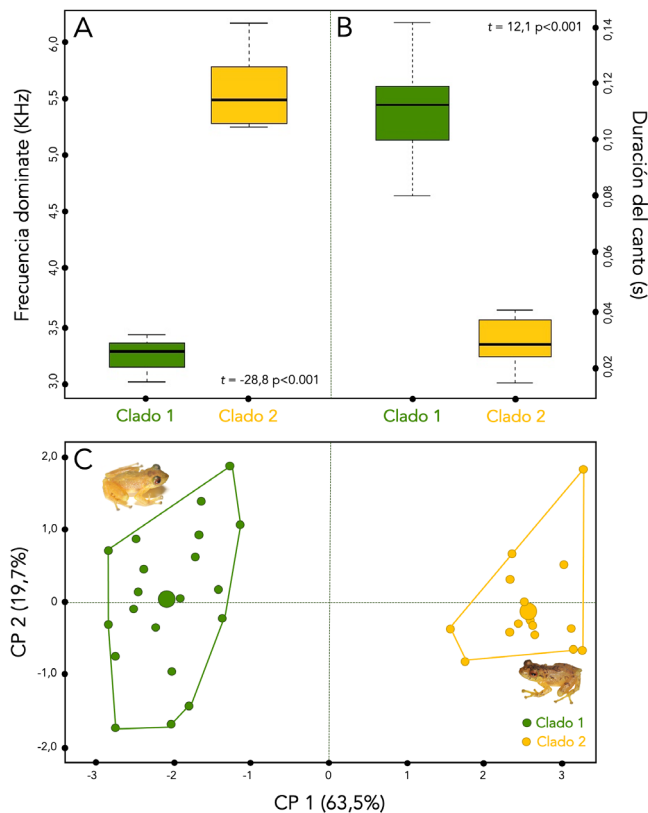


Figure 5. Variation in spectral and temporal characteristics of advertisement calls between clade 1 and clade 2 associated with *Pristimantis dorsopictus*. (A) Significant differences in dominant frequency ($F = 909.8$; $P < 0.001$); (B) significant differences in calls duration ($F = 128.6$; $P < 0.001$); (C) clusters of the first two Principal Component Analysis (PCA) components explaining 82.3% of the overall variation at the acoustic level.

Figura 5. Variación en las características espectrales y temporales del canto de anuncio entre el clado 1 y clado 2 asociados con *Pristimantis dorsopictus*. (A) Diferencias significativas en la frecuencia dominante ($F = 909.8$; $P < 0.001$); (B) diferencias significativas en la duración del canto ($F = 128.6$; $P < 0.001$); (C) agrupaciones de los dos primeros componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP) explicando el 82,3 % de la variación global a nivel acústico.

modulación de frecuencia y con uno a tres armónicos (Fig. 4). A pesar de la similitud estructural, los análisis acústicos y estadísticos demuestran que hay diferencias significativas entre ambos agrupamientos para algunas variables espectrales y temporales (Tabla 1). La frecuencia dominante del Clado 1 fue de 3.09 ± 0.12 (2,87–3,27) kHz, mientras que para el Clado 2 fue de 5.55 ± 0.28 (5,25–6,19) kHz. La prueba t Student aplicada a los residuos de la regresión lineal indicó que, después de controlar el efecto del tamaño de los individuos sobre la frecuencia dominante, se siguen observando diferencias significativas entre

las poblaciones ($r^2 = 0.620$; $P < 0.05$; Fig. 5A). Los individuos del Clado 1 presentaron un canto de anuncio con mayor duración respecto al Clado 2 (Fig. 5B). Solo el intervalo entre cantos no mostró diferencias estadísticas entre los grupos (Tabla 1). Nuestro análisis multivariado muestra una clara distinción entre ambos clados, sin superposición (Fig. 6C).

En el análisis ACP, los dos primeros componentes explican el 83,2 % de la variación total; algunas variables que explican esta variación fueron la frecuencia dominante, frecuencia máxima y mínima y la duración del canto (Tabla 2). Los resultados del AFD mostraron que los individuos se clasifican correctamente en los Clado 1 y Clado 2, en el 100 % de los casos. La variación global resultante en los cantos de anuncio entre los dos clados

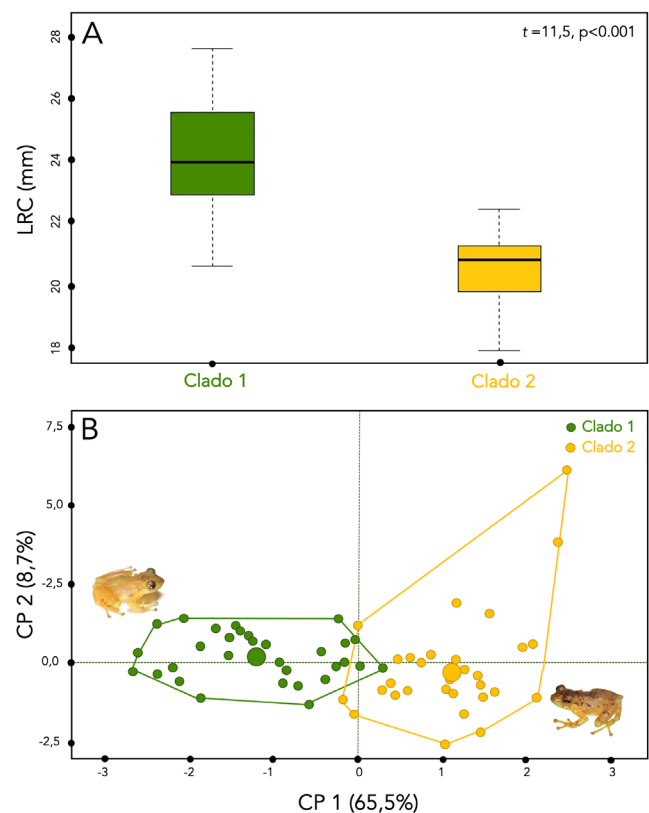


Figure 6. Multivariate analysis of morphometric measures between clade 1 and clade 2 associated with *Pristimantis dorsopictus*. (A) Principal Component Analysis (PCA) for the first two components; (B) clustering between the first two dimensions of the Discriminant Analysis (DA) representing 74.275% of the discrimination between groups.

Figura 6. Análisis multivariado de medidas morfométricas entre el clado 1 y clado 2 asociados a *Pristimantis dorsopictus*. (A) Análisis de Componentes Principales (ACP) para las dos primeras componentes; (B) agrupaciones entre las dos primeras dimensiones del Análisis Discriminante (AD) representando el 74.275% de la discriminación entre grupos.

Table 2. Results of Principal Component Analysis for acoustic variables from *Pristimantis dorsopictus sensu lato*.

Tabla 2. Resultados del Análisis de Componentes Principales para variables acústicas de *Pristimantis dorsopictus sensu lato*.

Parámetros acústicos	Componentes principales	
	CP1	CP2
Duración del canto (s)	-0.430	0.145
Ancho de banda (90 %)(kHz)	0.279	-0.198
Frecuencia Dominante (kHz)	0.461	-0.125
Frecuencia 5 % kHz	0.460	-0.121
Frecuencia 95 % kHz	0.463	-0.130
Cantos/min	-0.243	-0.644
Intervalos silenciosos (s)	0.195	0.691
Eigenvalor	4.447	1.377
Desviación estándar	2.109	1.173
Proporción de variación (%)	63.531	19.673
Proporción acumulada (%)	63.531	83.204

evaluados, mostró diferencias que implican una segregación en caracteres bioacústicos, tanto en los análisis univariados como multivariados.

Análisis morfométrico. Nuestros análisis, revelan variaciones en las medidas morfométricas entre los dos grupos evaluados (Tabla 3). Los resultados del ACP mostraron una separación entre los clados 1 y 2 con una variación total del 74,3 %, explicada por las dos primeras componentes, y aunque la mayoría de cargas contribuyeron en valores similares, las variables que mejor explicaron la variación fueron la longitud rostro-cloaca,

el ancho de la cabeza y el diámetro del tímpano (Fig. 6; Tabla 4). El primer componente que explica el 65,5 % de la variación, demostró ser significativamente diferente para los dos grupos ($P < 0,001$; $t = -11,71$). Los resultados del AFD mostraron que los individuos fueron clasificados correctamente ($n = 63$), en los dos clados propuestos en el 95,2 % de los casos, con solo un individuo clasificado erróneamente. Esto indica que, aunque hay un pequeño solapamiento entre individuos de diferentes grupos las diferencias entre caracteres morfométricos son suficientemente marcadas para asignarlos a uno u otro clado.

Red de haplotipos. Para el marcador COI identificamos 13 haplotipos diferentes, sin dominancia de alguno de ellos; recuperamos un total de 167 sitios de nucleótidos variables del total de 630 posiciones, sin inserciones o deleciones. De los haplotipos asignados a priori como pertenecientes a *Pristimantis dorsopictus*, la red recuperó tres agrupaciones con estructura geográfica, excepto para la localidad de Sónson con dos haplotipos marcadamente distantes. Geográficamente, de norte a sur, observamos una agrupación de dos haplotipos correspondiente a individuos de San Andrés de Cuerquia (los más divergentes) e individuos de Belmira, Medellín, El Carmen de Viboral y Sonsón todos pertenecientes al Clado 1 (en verde), y una segunda agrupación incluyendo individuos de Sonsón y Pensilvania pertenecientes al Clado 2 (en amarillo; Fig. 7).

Inferencia taxonómica. Los resultados de nuestros análisis filogenéticos revelan que *Pristimantis dorsopictus* no es monofilética y que integrando además la evidencia bioacústica, morfológica y morfométrica bajo este nombre actualmente se incluyen al menos dos linajes evolutivos independientes y fenotípicamente diagnosticables (Fig. 7). A pesar de que en la descripción de *Pristimantis dorsopictus*, Rivero y Serna (1988) no mencionan ningún carácter diagnóstico único de morfología externa para delimitar a esta especie, la obtención de nuevo material de la localidad tipo y comparación con la serie tipo sugieren que algunos de los especímenes obtenidos de Sonsón (Antioquia) y Pensilvania (Caldas) pertenecientes al Clado2 de nuestra inferencia filogenética, constituyen *P. dorsopictus sensu stricto*. Estos últimos son en promedio individuos más pequeños, con tubérculos cónicos y emiten un canto de anuncio más agudo y de menos duración (ver Resultados).

En consecuencia, reconocemos los individuos del norte de la Cordillera Central en los municipio de Bello, Belmira, El Carmen de Viboral, Medellín, San Andrés de Cuerquia y algunos de Sónson, todos estos pertenecientes al Clado 1, como una nueva especie (Fig. 8), que describiremos formalmente.

SISTEMÁTICA

Pristimantis dorsopictus (Rivero y Serna, 1998)

La descripción proporcionada por Rivero y Serna (1998) es adecuada; sin embargo, algunos individuos de la serie tipo corresponden a hembras subadultas (6 individuos) y juveniles (2 individuos). Además, especímenes adicionales, observaciones en campo, variación de estructuras morfológicas y de coloración y atributos de la historia natural han sido registrado en las últimas dos décadas, lo que ha proporcionado nueva información de la especie. Por lo tanto presentamos una definición enmendada a partir de la revisión de la serie tipo (28 individuos) y 23 nuevos individuos de colecciones recientes.

Definición. *Pristimantis dorsopictus* se caracteriza por la siguiente combinación de caracteres: (1) piel del dorso lisa con algunos tubérculos redondeados; pliegues dorsolaterales ausentes; vientre areolado; pliegue discoidal anterior a la ingle; (2) tímpano superficial, redondo, orientado lateralmente; anillo timpánico prominente; membrana timpánica parcialmente translúcida; DT = 38–48 % del DO; pliegue supratimpánico presente, cubriendo la margen superior del anillo timpánico; (3) uno a tres tubérculos postrictales presentes, cónicos; (4) hocico corto, acuminado en vista dorsal, redondo en vista lateral, con pequeña papila en la punta del hocico; *canthus rostralis* cóncavo en vista dorsal, ligeramente redondo en sección transversal; (5) párpado superior con un tubérculo cónico prominente rodeado por algunos tubérculos redondeados pequeños; párpado más estrecho que la distancia interorbital; (6) crestas craneales ausentes; (7) coanas pequeñas, ovoides, no cubiertas por el paladar; procesos vomerianos posteriores al nivel de las coanas; moderadamente separados, con 2 a 4 dientes cada uno; (8) machos con hendiduras vocales, con saco vocal subgular y almohadillas nupciales blancas, glandulares; (9) dedo I del mano menor que el dedo II; discos moderadamente expandidos en los dedos de la mano III–IV; (10) dedos con rebordes cutáneos laterales; tubérculo palmar divido; tubérculo tenar ovoide, ligeramente menor que palmar; tubérculos supernumerarios bajos; tubérculos subaticulares con base redonda, mayores que los tubérculos supernumerarios (11) tubérculos ulnares subcónicos; (12) talón con un tubérculo pequeño, pequeños tubérculos en el borde externo de la rodilla, canilla y tarso; pliegue tarsal interno ausente; (13) tubérculo metatarsal externo cónico, tubérculo metatarsal interno elíptico, el doble de tamaño del externo; abundantes tubérculos supernumerarios bajos, redondos; (14) dedos del pie sin rebordes cutáneos laterales o indistintos; discos grandes, más anchos que el ancho de los dedos; sin membranas interdigitales; dedo V más largo que el dedo III y alcanza el límite proximal del tubérculo

subarticular del dedo IV; tubérculo hiperdistal presente en todos los dedos; (15) dorso amarillo claro, amarillo limón o café con bandas longitudinales o manchas en forma de V de color café oscuro, salmón o verde oliva (Fig. 8); superficies ocultas de los muslos y flancos amarillas; garganta y saco vocal amarillo pálido; vientre con peritoneo crema; superficies ocultas de las axilas e ingles amarillas; superficies anteriores de los muslos y piernas amarillas a café pálido; superficie ventral de las extremidades posteriores amarilla con puntos negros; (16) iris rojo cobrizo más oscuro hacia la pupila, con retículos café oscuro a negros; (17) LRC en hembras: 32.2–32.4 mm (n = 2); en machos: 17.3–22.5 mm (19.99 ± 1.096 , n = 35); (18) canto de anuncio compuesto por una nota pulsada, con uno a tres armónicos, de 0.03 ± 0.01 (0.01–0.04) segundos de duración, y una frecuencia dominante de 5.55 ± 0.28 (5.25–6.19) kHz.

Pristimantis cryptopictus sp. nov.

(Figs. 9 y 10)

Pristimantis dorsopictus —Rivera-Correa y Daza (2016)

Pristimantis dorsopictus —Rivera-Correa, Jiménez y Daza (2017)

Pristimantis dorsopictus —Patiño-Ocampo, López-Murillo y Rivera-Correa (2021)

Holotipo. MHUA-A 12478 macho adulto (Fig. 9), colectado en Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio El Carmen de Viboral, Vereda La Madera, vía El Carmen de Viboral-La Unión (6.032961° N, 75.327789° W, 2660 m s.n.m.), colectado 29 de junio de 2019 por Eliza Patiño-Ocampo, Andrés Castaño, Khristian Venegas, Diego Botero y Mauricio Rivera-Correa.

Paratipos. MHUA-A 12476–77, MHUA-A 12479, tres machos adultos, datos iguales a los del holotipo. MHUA-A 6251, macho adulto, Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio de Medellín, Corregimiento de Santa Elena, Reserva Natural Montevivo (6.208527778° N, 75.4911111° W, 2560 m s.n.m.), colectado en el 2017 por Laura Bravo. MHUA-A 7455, macho adulto, Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio de Belmira, Vereda Montanitas, Reserva Corantioquia (6.61457° N, 75.6309° W, 2872 m s.n.m.), colectado en el 2012 por Laura Bravo. MHUA-A 7638, macho adulto, Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio de Belmira, Vereda Río Arriba, Páramo del Sol (6.622391° N, 75.645416° W, 3100 m s.n.m.), colectado en el 2011 por Carlos Jiménez y Carlos Botero. MHUA-A 7855–56, dos machos adultos, Colombia, Departamento de Antioquia,

Table 3. Descriptive statistics (mean $\pm$ SD, minimum-maximum) for the 16 morphometric characters measured in male specimens corresponding to clades 1 and 2 of *Pristimantis dorsopictus sensu lato*. All variables measured in millimeters.

Tabla 3. Estadística descriptiva (media $\pm$ DE, mínimo-máximo) para los 16 caracteres morfométricos medidos en los especímenes machos correspondientes a los clados 1 y 2 de *Pristimantis dorsopictus sensu lato*. Todas las variables medidas en milímetros.

	Estadística descriptiva	
	Clado 1 n = 30	Clado 2 n = 35
LRC	24.085 $\pm$ 1.660 (20.59–27.230)	19.992 $\pm$ 1.096 (17.290–22.470)
AC	8.752 $\pm$ 0.616 (7.850–9.780)	7.156 $\pm$ 0.516 (5.810–8.320)
LC	8.374 $\pm$ 0.576 (7.120–9.470)	7.058 $\pm$ 0.572 (5.840–8.370)
DIO	3.216 $\pm$ 0.233 (2.790–3.820)	2.548 $\pm$ 0.319 (2.100–3.470)
DIN	1.832 $\pm$ 0.120 (1.620–2.190)	1.782 $\pm$ 0.228 (0.980–2.150)
DO	2.977 $\pm$ 0.335 (2.340–3.800)	2.635 $\pm$ 0.289 (2.030–3.130)
DT	1.295 $\pm$ 0.150 (1.050–1.630)	1.195 $\pm$ 0.159 (0.890–1.560)
DON	2.487 $\pm$ 0.199 (2.040–2.890)	2.009 $\pm$ 0.201 (1.640–2.380)
LH	3.801 $\pm$ 0.302 (3.230–4.340)	3.245 $\pm$ 0.291 (2.560–3.760)
LP	16.277 $\pm$ 1.386 (14.020–18.530)	13.245 $\pm$ 1.114 (11.210–16.060)
LT	12.311 $\pm$ 0.771 (10.980–13.790)	10.359 $\pm$ 0.454 (9.330–11.370)
LFM	11.622 $\pm$ 0.888 (9.530–13.300)	9.347 $\pm$ 0.7521 (7.900–11.450)
LM	7.394 $\pm$ 0.599 (6.230–8.440)	6.038 $\pm$ 0.468 (4.530–6.940)
LAB	5.608 $\pm$ 0.749 (4.480–7.380)	4.784 $\pm$ 0.488 (4.120–6.00)
APS	2.143 $\pm$ 0.238 (1.700–2.550)	1.791 $\pm$ 0.236 (1.160–2.150)
ADIV	1.283 $\pm$ 0.129 (1.040–1.560)	1.100 $\pm$ 0.230 (0.750–1.570)

Municipio de Medellín, Corregimiento de Santa Elena, Reserva Natural Montevivo (6.211347° N, 75.489166° W, 2610 m s.n.m.), colectado 19 de enero del 2013 por Alejandro Montoya. MHUA-A 08960, MHUA-A 12473, dos machos adultos, Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio de Bello, Corregimiento de San Félix, Vereda Las Huertas, Quebrada El Hato (6.331388889°

Table 4. Results of Principal Component Analysis for morphometric measurements of *Pristimantis dorsopictus sensu lato*.

Tabla 4. Resultados del Análisis de Componentes Principales para las medidas morfométricas de *Pristimantis dorsopictus sensu lato*.

Variables morfométricas	Componentes principales	
	CP1	CP2
LRC	-0.294	0.020
AC	-0.298	-0.055
LC	-0.282	-0.023
DIO	-0.271	0.142
DIN	-0.126	-0.562
DO	-0.209	-0.324
DT	0.055	0.577
DON	-0.281	0.095
LH	-0.278	-0.059
LP	-0.265	0.247
LT	-0.275	0.175
LFM	-0.283	0.093
LM	-0.289	0.026
LAB	-0.250	0.154
APS	-0.219	-0.280
ADIV	-0.179	0.079
Eigenvalor	10.487	1.397
Desviación estándar	3.238	1.182
Proporción de varianza (%)	65.542	8.732
Proporción acumulada (%)	65.542	74.275

N, 75.6361111° W, 2660 m s.n.m.), colectado 5 de junio de 2010 por Alejandro Montoya, Felipe Duarte y Mauricio Rivera-Correa.

MHUA-A 12474–75, machos adultos, colectados en Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio El Carmen de Viboral,

Vereda La Madera, vía El Carmen de Viboral-La Unión (6.032961° N, 75.327789° W, 2660 m s.n.m.), colectado 29 de marzo de 2018 por Juan Pablo Giraldo, Juan Pablo Zuluaga, Khristian Venegas, Diego Botero y Mauricio Rivera-Correa. MHUAA 12480, macho adulto, Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio de Sonsón, Vereda Roblalito B, Alto Cerro Cristo Rey, vía Sonsón-Nariño (5.7009° N, 75.24971667° W, 2800 m s.n.m.), colectado el 27 de diciembre de 2018 por Eliza Patiño-Ocampo, Andrés Castaño, Khristian Venegas, Diego Botero, y Hader Correa. MHUAA 12505, macho adulto, Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio de Sonsón, Vereda Roblalito B, Alto Cerro Cristo Rey, vía Sonsón-Nariño (5.7009° N, 75.24971667° W, 2800 m s.n.m.), colectado el 27 de diciembre de 2018 por Eliza Patiño-Ocampo, Khristian Venegas, Diego Botero, Hader Correa y Mauricio Rivera-Correa. MHUA-A 12608-09, dos machos adultos, colectados en Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio El Carmen de Viboral, Vereda La Linda, cerca de la antigua escuela Veredal (5.96925° N, 75.281333° W, 2644 m s.n.m.), colectado 17 de noviembre de 2015 por Diego Rivera. MHUA-A 12618-19, dos machos adultos, colectados en Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio El Carmen de Viboral, Vereda La Linda, cerca de la antigua escuela Veredal (5.964611° N, 75.285444° W, 2566 m s.n.m.), colectado 20 de noviembre de 2015 por Diego Rivera.

Material referido. MHUA-A 12481, juvenil, colectado en Colombia, Departamento de Antioquia, Municipio El Carmen de Viboral, Vereda La Madera, vía El Carmen de Viboral-La Unión, (6.032961° N, 75.327789° W, 2660 m s.n.m.), colectado 29 de junio de 2019 por Eliza Patiño-Ocampo, Andrés Castaño, Khristian Venegas, Diego Botero, y Mauricio Rivera-Correa.

Etimología. El epíteto específico *cryptopictus* está compuesto de la palabra de origen griego *kryptos* (oculto, secreto) y la palabra de origen latino *pictus* (pintado, manchado). El epíteto específico es un adjetivo que hace referencia a que esta nueva especie permaneció oculta bajo el nombre de *Pristimantis dorsopictus* por más de tres décadas. Al igual que esta última, la especie nueva presenta un patrón de manchas y puntos irregulares en su cuerpo.

Posición genérica. Basados en su posición filogenética asignamos la nueva especie al género *Pristimantis*, como parte del grupo de especies de *Pristimantis boulengeri*. De acuerdo a González-Durán et al. (2017), los miembros de este grupo comparten los siguientes estados de caracteres morfológicos, propuestos como sinapomorfias del grupo: (1) presencia de un tubérculo hiperdistal en el dedo III de la mano; (2) presencia de un tubérculo hiperdistal en el dedo IV de la mano; (3) peritoneo

parietal cubierto con iridóforos; (4) saco vocal externo extendido; (5) hocico con papila dérmica.

Definición. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. se caracterizada por la siguiente combinación de caracteres: (1) piel del dorso lisa, con algunos tubérculos redondeados y planos esparcidos en los flancos; pliegues dorsolaterales ausentes; vientre areolado; pliegue pectoral y discoidal presentes; (2) tímpano redondeado; DT = 40–50 % del DO; margen superior cubierto por el pliegue supratimpánico; anillo timpánico y membrana timpánica presentes, (3) uno o dos tubérculos postrictales subcónicos pequeños; (4) hocico acuminado en vista dorsal, con papila en la punta del hocico; (5) párpado superior con un tubérculo redondeado rodeado por algunos tubérculos redondos más pequeños; párpado más estrecho que la distancia interorbital; (6) crestas craneales ausentes; (7) coanas visibles, procesos de los odontóforos vomerianos pequeños, oblicuos, posteriores a las coanas y moderadamente separados, con 3 a 5 dientes cada uno; (8) machos con hendiduras vocales, con saco vocal subgular y almohadillas nupciales no queratinizadas; (9) dedo I de la mano menor que el dedo II; discos de los dedos de la mano II al IV moderadamente expandidos; dedo III con tubérculo subarticular distal simple y dedo IV con tubérculo subarticular distal doble; (10) dedos sin rebordes cutáneos; tubérculo palmar dividido; tubérculo tenar ovoide, ligeramente más pequeño que palmar; tubérculos supernumerarios bajos; tubérculos subarticulares con base redonda, más grandes que tubérculos supernumerarios; (11) tubérculos ulnares presentes, bajos; (12) tubérculo calcar ausente; pequeños tubérculos presentes en el borde externo de la pierna, rodilla y tarso; pliegue tarsal interno presente; (13) tubérculo metatarsal externo cónico, tubérculo metatarsal interno elíptico, el doble de tamaño del externo; abundantes tubérculos supernumerarios bajos, redondos; (14) dedos del pie sin rebordes cutáneos laterales o indistintos; discos grandes, más anchos que el ancho de los dedos; sin membranas interdigitales; dedo V más largo que el dedo III y alcanza el límite proximal del tubérculo subarticular del dedo IV; tubérculo hiperdistal presente en todos los dedos; (15) dorso amarillo claro, naranja o café oscuro, con o sin puntos, con o sin manchas irregulares en todo el cuerpo, pero sin franjas o líneas longitudinales; superficies ocultas de los muslos y flancos inmaculadas, de color amarillo o café crema; garganta y saco vocal amarillos; vientre con peritoneo blanco a crema; superficies ocultas de las axilas e ingles amarillas; superficies anteriores de los muslos y piernas amarillas; superficies posteriores de los muslos inmaculados y amarillos; (16) iris rojo cobrizo, más oscuro hacia la pupila, con retículos café a negros; (17) LRC en machos: 20.6–27.2 mm (24.08 ± 1.66; n = 30), hembras desconocidas; (18) canto de anuncio compuesto por una nota pulsada, con uno a tres armónicos, de

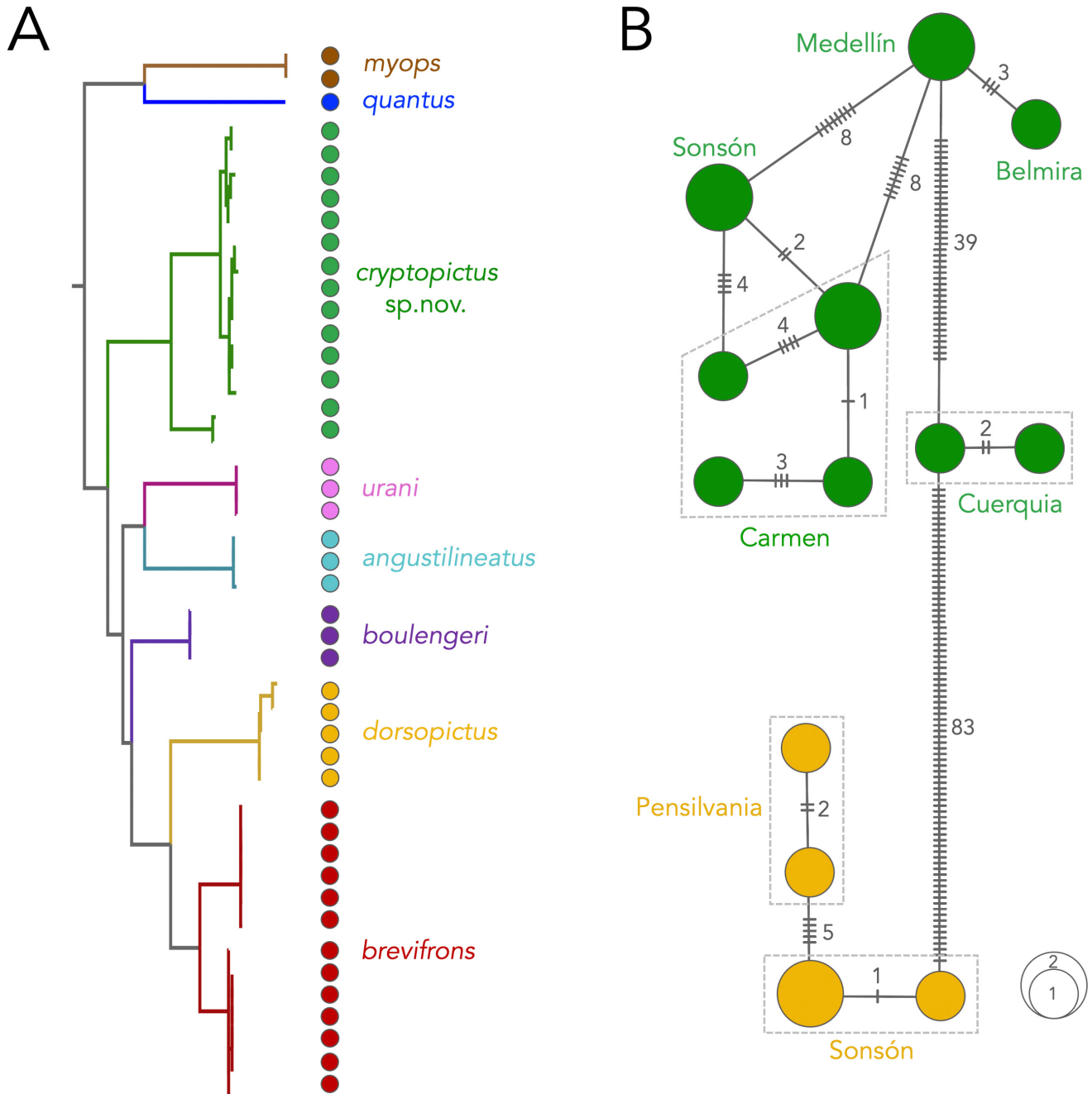


Figure 7. (A) Phylogenetic relationships based on Figure 3, detailing the new taxonomic determination from molecular, bioacoustics and morphological evidence; (B) haplotype network based on 630 bp of the COI region for *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. in green and *P. dorsopictus* in yellow. The names in the net refer to the localities where the haplotypes originate and the dotted boxes refer to different haplotypes in the same locality. The numbers indicate the total number of mutations between haplotypes and the size of the circles represents the number of individuals possessing the same haplotype. Note the number of mutations in the San Andrés de Cuerquia population (deepest clade) for *P. cryptopictus* sp. nov.

Figura 7. (A) Relaciones filogenéticas basado en la figura 3, detallando la nueva determinación taxonómica a partir de la evidencia molecular, bioacústica y morfológica; (B) red de haplotipos basada en 630 pb de la región COI para *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. en verde y *P. dorsopictus* en amarillo. Los nombres en la red hacen referencia a las localidades donde provienen los haplotipos y los recuadros punteados hacen referencia a diferentes haplotipos en una misma localidad. Los números indican el total de mutaciones entre haplotipos y el tamaño de los círculos representa el número de individuos que poseen el mismo haplotipo. Note el número de mutaciones de la población de San Andrés de Cuerquia (clado más profundo) para la *P. cryptopictus* sp. nov.

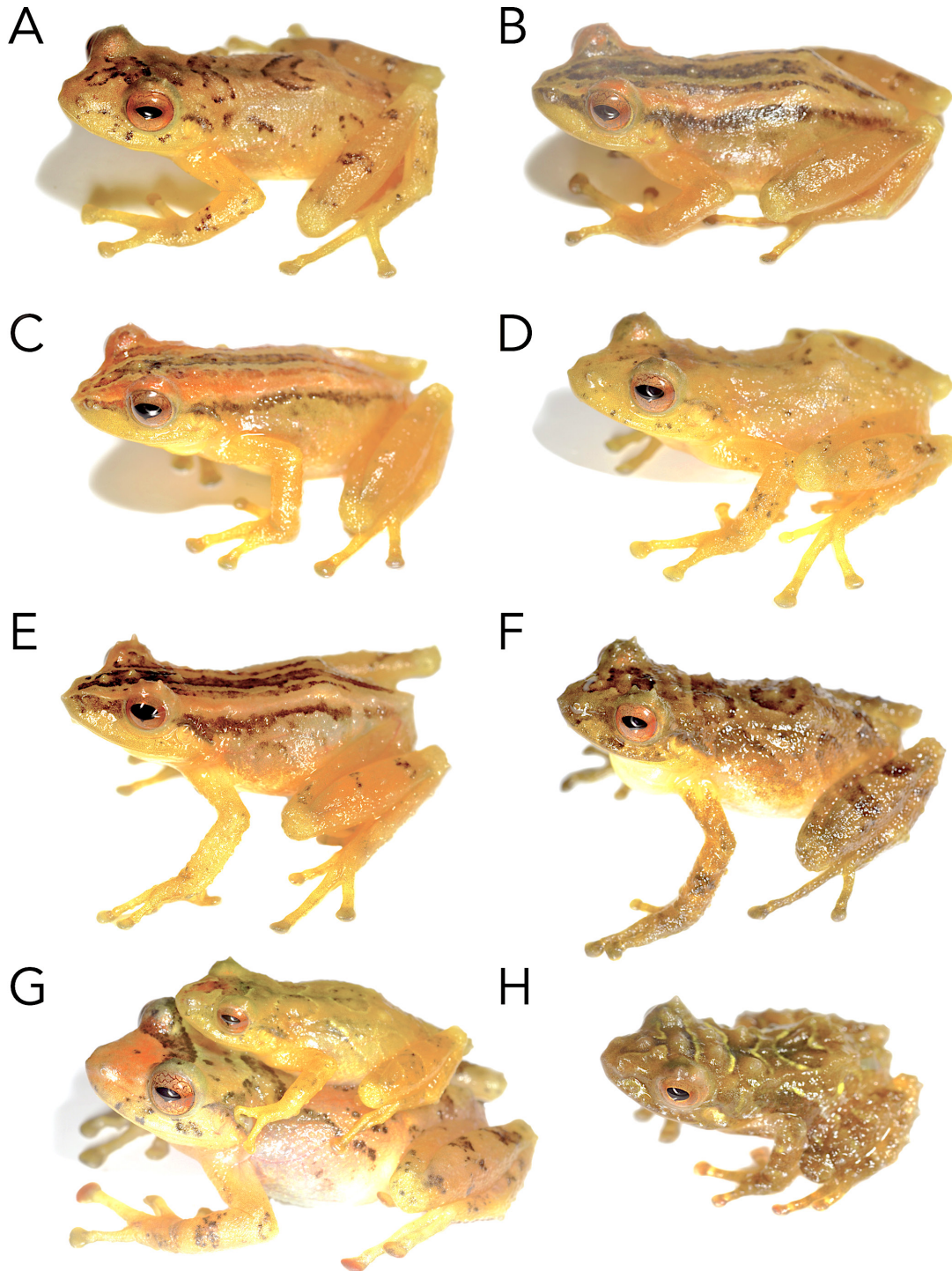


Figure 8. *Pristimantis dorsopictus* in life: (A) MHUA-A 12483, SVL 19.1 mm, adult male; (B) MHUA-A 12482, SVL 20.1 mm, adult male; (C) MHUA-A 12490, SVL 19.6 mm, adult male; (D) MHUA-A 12499, SVL 20.9 mm, adult male; (E) MHUA-A 12501, SVL 18.7 mm, adult male; (F) MHUA-A 12502, SVL 20.0 mm, adult male; (G) MHUA-A 12493, SVL 20.8 mm, adult male; MHUA-A 12494, SVL 30.8 mm, adult female; (H) MHUA-A 12503, SVL 10.1 mm, juvenile. Photos: MRC

Figura 8. *Pristimantis dorsopictus* en vida: (A) MHUA-A 12483, SVL 19.1 mm, macho adulto; (B) MHUA-A 12482, SVL 20.1 mm, macho adulto; (C) MHUA-A 12490, SVL 19.6 mm, macho adulto; (D) MHUA-A 12499, SVL 20.9 mm, macho adulto; (E) MHUA-A 12501, SVL 18.7 mm, macho adulto; (F) MHUA-A 12502, SVL 20.0 mm, macho adulto; (G) MHUA-A 12493, SVL 20.8 mm, macho adulto; MHUA-A 12494, SVL 30.8 mm, hembra adulta; (H) MHUA-A 12503, SVL 10.1 mm, juvenil. Fotos: MRC.

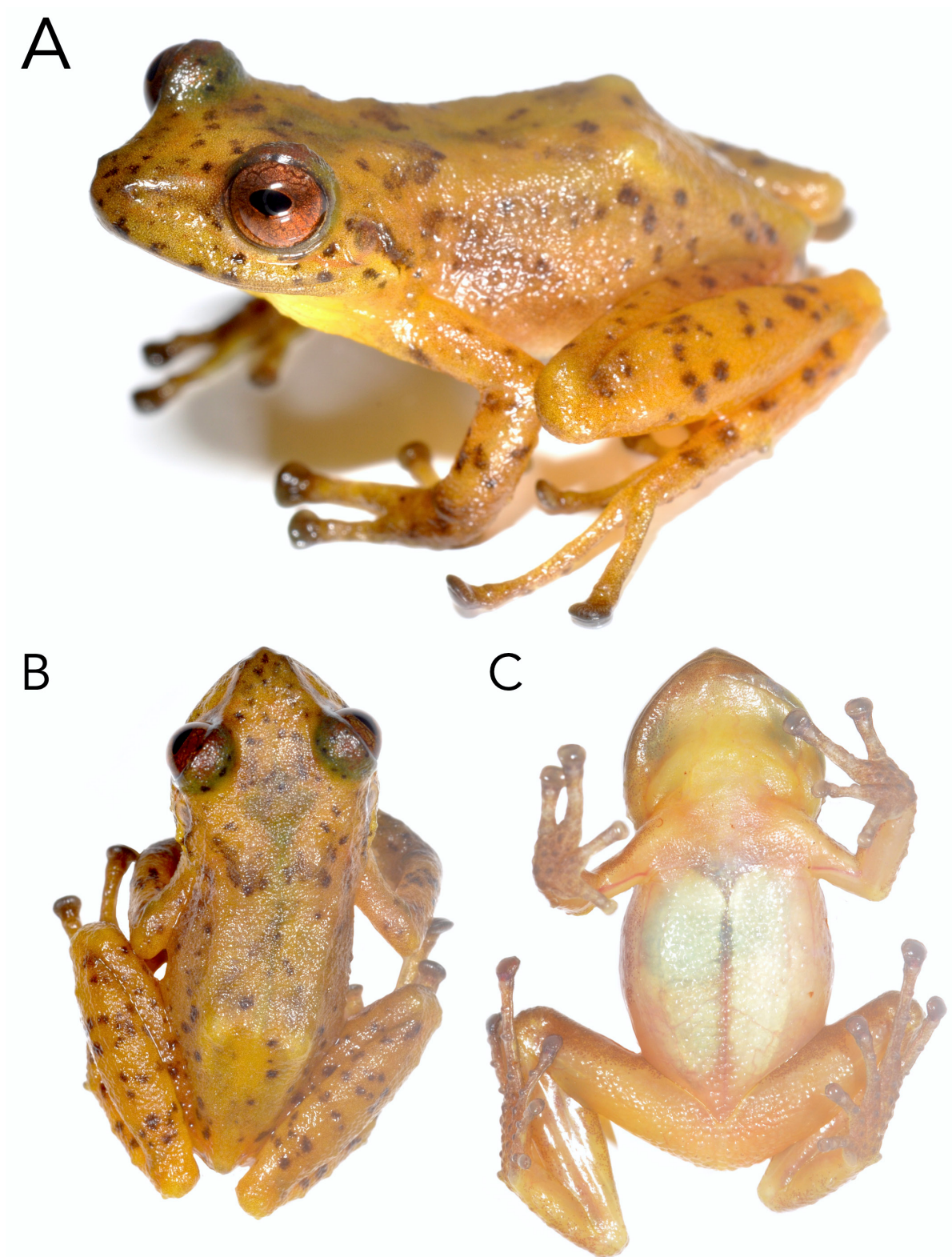


Figure 9. Holotype of *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. MHUA-A 12478, SVL 23.5 mm, adult male. Photos: MRC

Figura 9. Holotipo de *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. MHUA-A 12478, SVL 23.5 mm, macho adulto. Fotos: MRC.

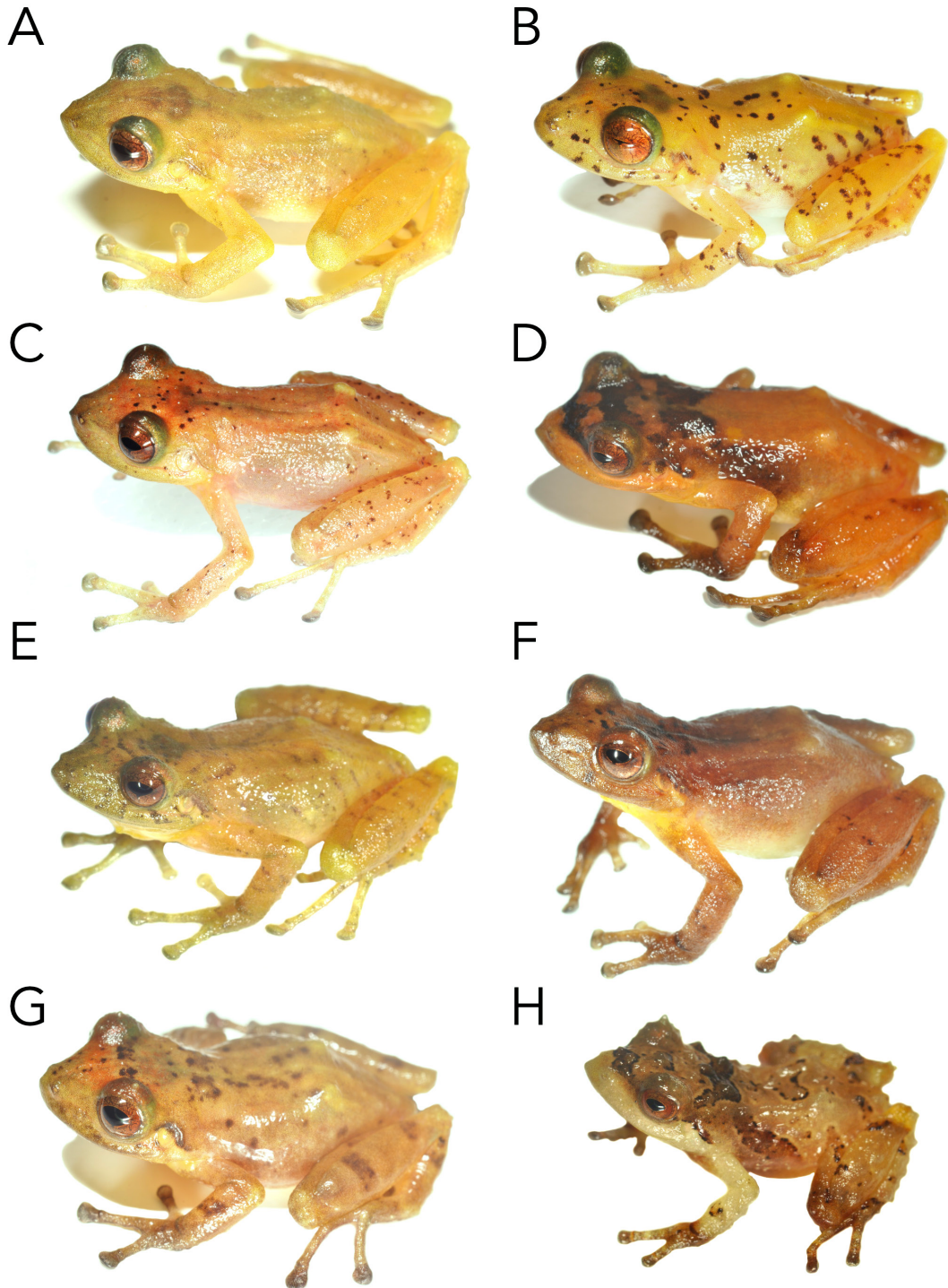


Figure 10. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. in life: (A) MHUA-A 12480, SVL 22.9 mm, adult male; (B) MHUA-A 12618, SVL 23.3 mm, adult male; (C) MHUA-A 12608, SVL 22.3 mm, adult male; (D) MHUA-A 12476, SVL 23.8 mm, adult male; (E) MHUA-A 12474, SVL 23.0 mm, adult male; (F) MHUA-A 12475, SVL 21.7 mm, adult male; (G) MHUA-A 12479, SVL 23.1 mm, adult male; (H) MHUA-A 12481, SVL 9.9 mm, juvenile. Photos: MRC.

Figura 10. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. en vida: (A) MHUA-A 12480, SVL 22.9 mm, macho adulto; (B) MHUA-A 12618, SVL 23.3 mm, macho adulto; (C) MHUA-A 12608, SVL 22.3 mm, macho adulto; (D) MHUA-A 12476, SVL 23.8 mm, macho adulto; (E) MHUA-A 12474, SVL 23.0 mm, macho adulto; (F) MHUA-A 12475, SVL 21.7 mm, macho adulto; (G) MHUA-A 12479, SVL 23.1 mm, macho adulto; (H) MHUA-A 12481, SVL 9.9 mm, juvenil. Fotos: MRC.

0.10 ± 0.02 (0.04–0.14) segundos de duración, y una frecuencia dominante de 3.09 ± 0.12 (2.87–3.27) kHz.

Descripción del holotipo. Macho adulto, cabeza ligeramente más ancha que larga; hocico corto con una papila cónica en la punta, acuminado en vista dorsal, corto y curvado antero-ventralmente en vista lateral; LH = 15 % de LRC); *canthus rostralis* distintivo, recto; región loreal ligeramente cóncava; narinas dirigidas antero lateralmente; área entre las narinas ligeramente cóncava en vista dorsal; área interorbital plana, sin tubérculos, más ancha que el párpado superior, el cual equivale al 69 % la distancia interorbital; crestas craneales ausentes; párpado superior con un tubérculo pequeño, redondeado, bajo, rodeado de tubérculos aún más pequeños; membrana timpánica y anillo timpánico distintos; DT = 44 % del DO; pliegue supratimpánico diferenciado; dos tubérculos postrictales subcónicos.

Coanas pequeñas, elípticas, no cubiertas por el piso palatal del maxilar; procesos odontóforos vomerianos pequeños, oblicuos, posteriores a las coanas y moderadamente separados entre sí, cada uno con 3 dientes; lengua más larga que ancha, de forma acorazonada, la mitad posterior libre. Textura de la piel del dorso lisa; flancos finamente granulares; pliegues dorsolaterales ausentes, pliegue pectoral y discoidal conspicuos, este último se extiende desde la mitad de los flancos; funda cloacal ausente; con un par de tubérculos pequeños y planos ventrales a la cloaca. Antebrazo delgado; LAB = 21% del LRC; tres tubérculos ulnares presentes sin formar un pliegue; longitud de la mano mayor que longitud del radio-ulna (LM = 30 % de la LRC); dedo sin rebordes cutáneos; longitudes relativas de los dedos: I < II < IV < III; tubérculo palmar bífido, tubérculo tenar ovalado, poco definido; tubérculos subarticulares redondos, bajos; tubérculos supernumerarios bajos, bien definidos, localizados en la base de todos los dedos; disco del dedo I débilmente expandido (estado 0), discos de los dedos II–IV moderadamente expandidos (estado 1); todos los discos con almohadillas ventrales elípticas definidas por surcos marginales. Excrecencias nupciales presentes, en la región preaxial, blancas conspicuas y no queratinizadas.

Extremidades posteriores delgadas; LT = 50 % de la LRC; LT = 87% de la LP; LP = 58 % de la LRC; pliegue tarsal presente; tubérculos tarsales bajos, poco conspicuos; talón sin tubérculo calcar evidente, algunos pequeños casi imperceptibles; dedos de los pies sin pliegues laterales; tubérculos subarticulares redondos, bajos; tubérculo metatarsiano interno ovalado, aproximadamente el doble de largo que ancho; tubérculo metatarsiano externo cónico; tubérculos plantares supernumerarios conspicuos; discos de los dedos del pie transversalmente elípticos, I-II débilmente expandidos (estado

0), III-V moderadamente expandidos (estado 1), con almohadillas definidas; longitudes relativas de los dedos de los pies: I < II < III < V < IV; la punta del dedo V alcanza el borde proximal de tubérculo subarticular medio del dedo IV; la punta del dedo III alcanza el borde proximal del tubérculo subarticular medio del dedo IV.

Coloración del holotipo. En vida, dorso naranja pálido, con puntos y manchas de color marrón oscuro; párpados marrón verdoso; pliegue supra-timpánico y región superior de la membrana timpánica marrón naranja; discos de los dedos de color marrón. Superficie ventral: amarillo en la garganta y el saco vocal; región ventral del labio con puntos café; vientre translucido; peritoneo blanco a crema; brazos, región axilar, piernas, región inguinal y parte posterior de los muslos naranja. Parte anterior de los muslos, discos y tubérculos de palmas y plantas con puntos marrón grisáceo. Iris rojo cobrizo con retículos marrón oscuro. En alcohol, el cuerpo se tornó marrón oscuro, excepto en la región del urostilo y extremidades, donde se tornó marrón claro a crema; dedos I y II de la mano y del pie marrón claro; garganta, vientre y región medial ventral de las extremidades crema. Palmas y plantas color crema con pequeños puntos marrón oscuro.

Medidas del holotipo (mm). LRC: 24.2; AC: 8.5; LC: 8.4; DIO: 3.1; DIN: 1.8; DO: 2.9; DT: 1.3; DON: 2.6; LH: 3.7; LP: 14.0; LT: 12.2; LFM: 11.5; LM: 7.1; LAB: 5.3; APS: 2.3; ADIV: 1.2.

Variación. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. es una especie polimórfica en coloración, con variación dorsal desde amarillo claro o naranja, a café rojizo o café oscuro (Fig. 10). Los especímenes pueden presentar puntos y manchas irregulares dorsolaterales, algunos con manchas grandes en la región interocular y cantal (MHUA-A12476); en algunos casos, las manchas pequeñas pueden dar lugar a rayas continuas con secciones intermedias difusas. Una banda supratimpánica de puntos agregados puede estar presente y las terminaciones de los dedos pueden tener apariencia sucia por agregaciones de puntos café (MHUA-A 12475). La papila del rostro varía en tamaño, en algunos individuos es poco conspicua en vida (MHUA-A 12475, 12479, 12481, 12618), pero siempre presente. En algunos especímenes fijados se pierde parcialmente los tubérculos tarsales.

El espécimen MHUA-A 12477 presenta una línea clara dorsolateral que se extiende hacia la región del urostilo que le confiere un aspecto de falso pliegue. Existe variación en el número dientes (de 3 a 5) en los odontóforos vomerianos; en algunos casos la distancia entre odontóforos es menor que el

tamaño del proceso; el tamaño de los procesos odontóforos puede llegar a ser mayor que el diámetro de las coanas. El tamaño corporal de los adultos varía entre localidades, siendo mayores aquellos provenientes de los municipios más al norte de la distribución, es decir, Belmira (MHUA-A 7455, 7638) y San Andrés de Cuerquia (MHUA-A 12484-85). El juvenil (MHUA-A 12503) es muy tuberculado (Fig. 10H). La variación de las mediciones morfométricas se presentan en la Tabla 3.

Diagnosis comparativa. *Pristimantis cryptopictus* se diferencia de especies estrechamente relacionadas por la ausencia del pliegue dorsolateral (presente en *P. baiotis* y poco definido en *P. quantus*), piel lisa con tubérculos dispersos (lisa en *P. angustilineatus* y *P. urani*; finamente granular en *P. baiotis* y *P. boulengeri*), hocico acuminado en vista dorsal, con papila en la punta (subacuminado en el resto de las especies, excepto *P. baiotis*), tubérculo redondo en párpado (tubérculos cónicos en *P. baiotis*, *P. dorsopictus* y *P. quantus*; sin tubérculos en *P. angustilineatus*, *P. myops* y *P. urani*; tubérculos bajos en *P. boulengeri* y *P. brevifrons*), procesos dentígeros vomerianos oblicuos (ausente en *P. myops*, *P. quantus* y *P. urani*); discos con surcos marginales presentes (ausentes en *P. brevifrons*, *P. myops* y *P. quantus*), dedos de las manos y pies sin rebordes cutáneos laterales (presentes en *P. baiotis*, *P. brevifrons*, *P. myops*, *P. quantus* y *P. urani*); tubérculo calcar ausente (presente en *P. baiotis*, *P. boulengeri*, *P. dorsopictus*, *P. myops* y *P. quantus*), pliegue tarsal interno presente (ausente en *P. angustilineatus*, *P. baiotis*, *P. dorsopictus* y *P. urani*), superficies ventrales de extremidades posteriores sin patrón de manchas oscuras (manchas negras en *P. baiotis*, puntos oscuros en *P. dorsopictus*), y coloración de garganta amarilla o café (amarillo pálido en *P. boulengeri* y *P. dorsopictus*; crema en *P. baiotis*; gris en *P. myops*). Otros atributos diagnósticos en la Tabla 5.

Historia Natural y distribución geográfica. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. es una especie de hábitos nocturnos que habita bosques de niebla y subpáramos del norte de los Andes, también se encuentra en el borde de bosques con áreas abiertas (al margen de carreteras o pastizales). Ha sido observada perchada en arbustos y árboles entre 3 m y 15 m de altura; en algunas ocasiones vocalizando desde bromelias. Su actividad acústica inicia después de las 18:00 h, se puede extender hasta la madrugada y tiene lugar a lo largo de todo el año, en temporadas secas y de lluvia; las hembras son actualmente desconocidas. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. se distribuye desde los 2100 hasta los 3100 m s.n.m. y es conocida de varias localidades al norte de la Cordillera Central de los Andes en el departamento de Antioquia, incluyendo los municipios de Bello, Belmira, Caldas, El Carmen de Viboral, El Retiro, Envigado, La Ceja, La Unión, Medellín, Rionegro, San Andrés de Cuerquia, Santa Rosa de

Osos y Sonsón (puntos 1 al 8, Fig. 2; Apéndice 1). En esta última localidad cohabita en simpatría con *P. dorsopictus*.

DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos la divergencia genética, posición filogenética, variabilidad acústica y morfométrica de algunas poblaciones asignadas tradicionalmente a *Pristimantis dorsopictus*, una especie relativamente abundante en los bosques de alta montaña del norte de los Andes de Colombia. Nuestra inferencia filogenética es congruente con hipótesis previas (González-Durán et al., 2017; Rivera-Correa et al., 2017) en cuanto a la estrecha relación de los grupos *Pristimantis boulengeri* y *P. leptolophus*, ambos grupos endémicos de las cordilleras Central y Occidental de Colombia (Fig. 3). El grupo *P. boulengeri* es relativamente bien conocido desde una perspectiva filogenética, ya que siete de las ocho especies que lo integran, han sido incluidas en análisis previos (Rivera-Correa & Daza, 2016; González-Durán et al., 2017), excepto *P. baiotis*, conocida solo de la serie tipo y sin nuevos registros desde su descripción. A pesar de que la similitud morfológica de *P. baiotis* y *P. angustilineatus* hace suponer una relación filogenética próxima entre ambas (Lynch, 1998), esta hipótesis aún espera ser evaluada cuantitativamente (ver Fig. 7A).

La filogenia inferida por Rivera-Correa y Daza (2016) que hasta ahora fue la que incluyó el mayor conjunto de evidencia molecular y la mayor cantidad de terminales y especies para el grupo, recuperaron a *Pristimantis dorsopictus* estrechamente relacionada con *P. boulengeri* (*P. urani* + *P. brevifrons*). No obstante, los terminales determinados como *P. dorsopictus* en su estudio corresponden a las poblaciones delimitadas aquí como *P. cryptopictus* sp. nov. En términos genéticos, nuestro análisis reveló alta divergencia entre dos subclados de *P. cryptopictus* sp. nov., uno de los cuales agrupa la mayoría de las muestras y el otro constituido por dos especímenes de la población más al norte del departamento de Antioquia (i.e. San Andrés de Cuerquia), alcanzando porcentajes de 6,6 % para COI, y hasta 2,2 % para el 16S (Fig. 7B). Aunque las distancias genéticas fueron proporcionalmente más bajas en el segundo marcador, como es usual, estas divergencias genéticas entre ambos subclados podrían ser consecuencia de la variación acumulada por aislamiento geográfico entre las poblaciones (Wright, 1943). Trabajos recientes sobre taxonomía de *Pristimantis* han propuesto nuevas especies con valores relativamente bajos en distancias genéticas para la región 16S (e.g. Ortega-Andrade et al., 2015; Páez & Ron, 2019; Sánchez-Nivicela et al., 2021); no obstante, se requiere cautela si esta decisión no está apoyada por otras fuentes de evidencia, ya que la alta variación genética intraespecífica e

Table 5. Comparative diagnosis and character states among species of the *Pristimantis boulengeri* group. Morphology of species closely related to *P. cryptopictus* sp. nov. in Lynch (1981, 1998), Rivero and Serna (1988 "1987"), Rivera-Correa and Daza (2020).

Table 5. Diagnósis comparativa y estados de caracteres entre especies del grupo de *Pristimantis boulengeri*. Morfología de especies estrechamente relacionadas con *P. cryptopictus* sp. nov. en Lynch (1981, 1998), Rivero y Serna (1988 "1987"), Rivera-Correa y Daza (2020).

Especie	LRC	Textura de piel	Hocico en vista Dorsal	Hocico en vista de perfil	Tubérculos ven el párpado	Vomerinos	Hendiduras	Almohadillas nupciales	Coloración de garganta
<i>P. angustilineatus</i>	♂15.8 -20.4, n = 61; ♀20.8 -24.8, n = 18	Lisa	Subacuminado con papila	Agudamente Redondeado	Sin tubérculos	Medianos. bajos de 2 a 4	Presente	Presente	Amarillo
<i>P. baiotis</i>	♂18.1 -18.5, n = 3; ♀21.5, n = 1	Finamente granular	Acuminado sin papila	Protuberante	Tubérculos cónicos	Oblicuos. bajos	Presente	Presente	Crema
<i>P. boulengeri</i>	♂18.6-25.6, n = 87; ♀27.3-33.8, n = 17	Finamente granular	Subacuminado con papila	Agudamente redondeado	Bajos. no cónicos	Oblicuos de 2 a 5	Presente	Presente	Amarillo pálido
<i>P. brevifrons</i>	♂14.1-18.0, n = 63; ♀19.8-22.3, n = 3	Lisa a finamente granular	Subacuminado con papila	Protuberante	Bajos	Ausentes o pequeños	Presente	Ausente	Amarillo
<i>P. cryptopictus</i> sp. nov.	♂20.6-27.2, n = 30	Lisa con tubérculos dispersos	Acuminado con papila	Redondeado. corto	Tubérculos redondeados	Oblicuos de 3 a 5	Presente	Presente	Amarillo o café
<i>P. dorsopictus</i>	♂17.3-22.5, n = 35; ♀32.2-32.4, n = 2	Lisa con tubérculos dispersos	Acuminado con papila	Redondeado. corto	Tubérculo cónico	Pequeños e inconspicuos	Presente	Presente	Amarillo pálido
<i>P. myops</i>	♂10.9-13.6, n = 34; ♀14.6-17.2, n = 38	Tubérculos dispersos	Ovoide	Redondeado. corto	Ausente	Ausentes	Ausente	Ausente	Gris
<i>P. quantus</i>	♂11.6-14.5, n = 4; ♀14.4-16.7, n = 9	Tubérculos dispersos	Subacuminado con papila	Agudamente Redondeado	Tubérculo cónico	Ausentes	Presente	Ausente	Amarillo
<i>P. urani</i>	♂18.7-19.1, n = 2; ♀21.0-23.4, n = 4	Lisa	Redondeado	Truncado	Sin tubérculos	Ausentes	Presente	Presente	Amarillo

Table 5 (Cont.). Comparative diagnosis and character states among species of the *Pristimantis boulengeri* group. Morphology of species closely related to *P. cryptopictus* sp. nov. in Lynch (1981, 1998), Rivero and Serna (1988 "1987"), Rivera-Correa and Daza (2020).

Tabla 5 (Cont.). Diagnósis comparativa y estados de caracteres entre especies del grupo de *Pristimantis boulengeri*. Morfología de especies estrechamente relacionadas con *P. cryptopictus* sp. nov. en Lynch (1981, 1998), Rivero y Serna (1988 "1987"), Rivera-Correa y Daza (2020).

Especie	Reborde cutáneos mano	Tubérculos ulnares	Tubérculos en el talón	Tubérculos en borde externo del tarso	Plegue tarsal interno	Tubérculos metatarsal interno	Tubérculo metatarsal externo	Tubérculos supernumerarios	Rebordes cutáneos del pie	Coloración de superficie ventral de extremidades posteriores
<i>P. angustilineatus</i>	Ausente	Ausentes	Ausente	Ausente	Ausente	Elíptico 4X	Redondeado	Indistintos	Estrechos	Crema
<i>P. baiotis</i>	Presente	Subcónicos	Subcónicos	Presente	Ausente	Elíptico 3X	Redondeado	Presentes	Presentes	Crema con manchas negras
<i>P. boulengeri</i>	Ausente	Prominentes	Tubérculos no cónicos	Ausente	Presente	Elíptico 3-4X	Redondeado	Numerosos	Estrechos	Marrón amarillento
<i>P. brevifrons</i>	Presente	Presentes	Ausente	Presente	Presente	Elíptico 3-4X	Subcónico	Presentes	Presentes	Amarillo pálido
<i>P. cryptopictus</i> sp. nov.	Ausente	Presentes	Ausente	Pequeños	Presente	Elíptico 2X	Redondeado	Bajos	Ausente	Amarillo a café crema
<i>P. dorsopictus</i>	Ausente	Presentes	Presente	Presente	Ausente	Más pequeño que el externo	Alargado	Bajos	Ausente	Amarillo con puntos oscuros
<i>P. myops</i>	Presente	Prominentes, subcónicos	Presentes, pequeño	Presentes, subcónicos	Presente	Elíptico 6X	Redondeado	Presente, indistintos	Presente	Marrón oscuro a negro
<i>P. quantus</i>	Presente	Cónicos	Pequeños subcónicos	Pequeños subcónicos	Presente	Elíptico 4X	Cónico	Bajos	Ausente	Crema a marrón
<i>P. urani</i>	Presente	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausente	Elíptico 2-3X	Redondeado	Bajos	Ausente	Amarillo pálido

interpoblacional, ya ha sido previamente documentada para el género (Batista et al., 2014; Restrepo et al., 2017; Rivera-Correa et al., 2021a). Teniendo en cuenta lo anterior y a pesar de la alta divergencia en el subclado de San Andrés de Cuerquia (Fig. 7) decidimos considerarlo como parte de *P. cryptopictus* hasta que sea posible evaluar apropiadamente su estatus taxonómico con base en una serie mayor de especímenes, que provean futuros datos morfológicos, bioacústicos y moleculares.

Aquí presentamos solida evidencia filogenética, bioacústica y morfológica para delimitar *P. cryptopictus*, como una especie nueva, históricamente confundida con *P. dorsopictus*. *Pristimantis cryptopictus* sp. nov. fue recuperada, con alto soporte, como clado hermano de todas las especies del grupo *P. boulengeri*, excepto del clado más externo conformado *P. myops* y *P. quantus* (Fig. 7A), mientras que *P. dorsopictus* fue recuperada como estrechamente relacionada a *P. brevifrons*, con distancias genéticas entre 4,0 a 4,9% para 16S y 7,3 y 9,1 % para COI. *Pristimantis dorsopictus* fue descrita por Rivero y Serna (1988) con base en especímenes colectados entre 1982 y 1986 en el municipio de Sonsón (Antioquia) y usando exclusivamente evidencia morfológica. Desde entonces no hubo revisiones de los especímenes de la serie tipo hasta este trabajo, ni registros de visitas a la localidad tipo, excepto por algunos muestreos relativamente recientes (ver Rivera-Correa et al., 2017). Sumado a ello, la inexistencia de una nueva definición morfológica, así como de una caracterización bioacústica y molecular incluyendo individuos de la localidad tipo de *P. dorsopictus*, fueron las razones por las que *P. cryptopictus* permaneció confundida por más de tres décadas.

La mínima distancia genética encontrada en nuestro análisis fue de 3,0 % para el 16S entre *P. boulengeri* y un par de individuos de *P. cryptopictus* sp. nov., y de 7,1 % para COI entre *P. brevifrons* y *P. boulengeri* (Apéndices 3 y 4). Reconociendo el relativo buen muestreo molecular para estos dos marcadores en este grupo, estas divergencias sugieren valores que podrían constituir un punto de partida para elucidar el nivel de variación que eventualmente conducir a decisiones taxonómicas. Dicha divergencia en tales casos es crucial, para reconocer si las entidades evaluadas realmente representan especies candidatas no confirmadas o por el contrario, se trate de linajes conspecíficos profundamente divergentes de acuerdo a lo propuesto por Vieites et al. (2009). En consecuencia, las decisiones taxonómicas son muy sensibles a un relativo buen muestreo molecular a nivel geográfico, que se sumen además, a un representativo conjunto de datos fenotípicos diagnósticos.

Aunque las diferencias morfométricas entre los clados de *P. cryptopictus* sp. nov. y *P. dorsopictus* fueron significativas, las

divergencias bioacústicas fueron más decisivas (Fig. 6). Esto es consistente con estudios en anuros con morfología críptica (Padial et al., 2008; Angulo et al., 2010; Funk et al., 2012), ya que se sugiere que los caracteres acústicos evolucionan más rápido que la morfología, probablemente, debido a que los rasgos seleccionados sexualmente exhiben tasas evolutivas más rápidas (Funk et al., 2012; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2011). El canto de anuncio en anuros tiene un rol importante en procesos de reconocimiento de especies, selección de pareja y otras interacciones sociales (Wells, 2007; Bee, 2014; Pough et al., 2016), y ha sido una poderosa herramienta para contribuir en el establecimiento de los límites de especie (Schneider & Sinsch, 2007; Padial & De la Riva, 2009; Köhler et al., 2017; Hepp & Pombal, 2019) al considerarse como una fuerte barrera de aislamiento pre-cigótico. Aquí revelamos diferencias consistentes tanto en atributos espectrales y temporales entre *P. cryptopictus* y *P. dorsopictus* en particular, en la frecuencia dominante y en la duración del canto (Figs. 4 y 5; Tabla 1), atributos ampliamente empleados para diferenciar y diagnosticar especies (Padial & De la Riva, 2009; Köhler et al., 2017; Rodríguez et al., 2017; Fig. 6C).

Finalmente, las vocalizaciones de las especies que conforman el grupo *Pristimantis boulengeri* han sido relativamente poco documentadas. Solo se ha descrito el canto de anuncio para *P. boulengeri* (Ríos-Soto & Ospila-L, 2018) de una localidad diferente a la localidad tipo (i.e. municipio de Cajamarca, departamento del Tolima), para *P. brevifrons* (Arriaga-Jaramillo et al., 2021) y para *P. dorsopictus* y *P. cryptopictus* (en este trabajo). Por lo tanto, conocer los atributos acústicos no solo contribuye a comprender aspectos de la comunicación de las especies, sino que puede ayudar a elucidar los patrones evolutivos fenotípicos en este clado. Además, reconociendo la amplia distribución de algunas especies del grupo, por ejemplo, *P. boulengeri* y *P. brevifrons* (Ríos-Soto & Ospila-L, 2018; Acosta-Galvis, 2021), la evaluación de los cantos de anuncio a través de su distribución, podría contribuir a entender mejor el límite taxonómico de estas entidades, como ha sido el caso del presente estudio. En términos generales, los cantos de anuncio son atributos del género *Pristimantis* escasamente estudiados en Colombia (Rivera-Correa et al., 2021b); por lo tanto, futuros esfuerzos serán necesarios para documentar su diversidad, estructura y composición.

Agradecimientos.— Gracias a Khristian Venegas, Diego Botero, Hader Correa, Andrés Castaño, Juan P. Zuluaga, Juan P. Giraldo, Diego Rivera, Daniela Murillo, Andrés Toro y Cristian González por su asistencia en campo. Por el acceso a los especímenes, agradecemos al MHUA, CSJ (ITM), ICN y ARUQ. El Centro de Conservación Bioacústica del Laboratorio de Ornitología de Cornell otorgó la licencia para el uso de Raven

Pro. Al Grupo Herpetológico de Antioquia y Juan M. Daza por facilitar la infraestructura del laboratorio molecular a su cargo y por suministrar datos para este estudio. Este estudio contó con el apoyo financiero parcial del Comité de Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia en el marco del proyecto “Código de barras de ADN: Aproximación a la diversidad molecular de anfibios del norte, este y suroeste del departamento de Antioquia” (2017-17209) y fue producto parcial del trabajo de grado de la primera autora. El Comité de Ética para la Experimentación con Animales —CEEAA, otorgó aval de investigación mediante el Acta 118 del 5 de junio de 2018. El permiso de recolección fue otorgado mediante resolución 0524 de 27 de mayo de 2014, a la Universidad de Antioquia, por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales —ANLA. SDM agradece a Parques Nacionales Naturales de Colombia y a Wildlife Conservation Society —WCS, al Zoológico del Zúrich y Fundación Santo Domingo por el apoyo financiero y logístico bajo el Fondo de Investigación Mono Hernández. Finalmente, gracias a Fernando Rojas-Runjaic, Orlando Armesto y Juan Manuel Guayasamin por sus comentarios al manuscrito y a Katyuscia Araujo-Vieira por su acompañamiento editorial

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Appendix I. List of the specimens of *Pristimantis dorsopictus sensu lato* reviewed in this study and their localities of origin. MHUA: Museo de Herpetología Universidad de Antioquia; ARUQ: Colección de Anfibios y Reptiles de la Universidad del Quindío.

Apéndice I. Listado de los especímenes de *Pristimantis dorsopictus sensu lato* revisados en este estudio y sus localidades de origen. MHUA: Museo de Herpetología Universidad de Antioquia; ARUQ: Colección de Anfibios y Reptiles de la Universidad del Quindío.

Appendix II. Genbank (NCBI) accession numbers of 16S and COI mitochondrial DNA fragments used for phylogenetic analysis. Codes in bold correspond to new sequences generated in this study.

Apéndice II. Números de acceso a Genbank (NCBI) de los fragmentos de ADN mitocondrial 16S y COI usados para el análisis filogenético. Los códigos en negrita corresponden a secuencias nuevas generadas en este estudio.

Appendix III. Material evaluated from scientific collections.

Apéndice III. Material evaluado de colecciones científicas.

Appendix IV. Genetic distances in percentage for species of the *Pristimantis boulengeri* group from 630 bases of the COI region. Italicized numbers on the diagonal indicate intraspecific genetic diversity. *Clade 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clade 2 = *P. dorsopictus* (see text).

Apéndice IV. Distancias genéticas en porcentaje para las especies del grupo *Pristimantis boulengeri* a partir de 630 bases de la región COI. Los números en cursiva en la diagonal indican la diversidad genética intraespecífica. *Clado 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clado 2 = *P. dorsopictus* (ver texto).

Appendix V. Genetic distances in percentage for species of the *Pristimantis boulengeri* group from 565 bases of the 16S region. Numbers in italics on the diagonal indicate intraspecific genetic diversity. *Clade 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clade 2 = *P. dorsopictus* (see text).

Apéndice V. Distancias genéticas en porcentaje para las especies del grupo *Pristimantis boulengeri* a partir 565 bases de la región 16S. Los números en cursiva en la diagonal indican la diversidad genética intraespecífica. *Clado 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clado 2 = *P. dorsopictus* (see text).

LITERATURA CITADA

Acosta Galvis, A.R. 2021. Lista de los Anfibios de Colombia. Versión 11.2021. www.batrachia.com. Villa de Leyva, Boyacá, Colombia. [Consultado en junio 2021].

AmphibiaWeb. 2021. www.amphibiaweb.org. University of California, Berkeley, CA, USA. [Consultado en junio 2021].

Angulo, A. & J. Icochea. 2010. Cryptic species complexes, widespread species and conservation: lessons from Amazonian frogs of the *Leptodactylus marmoratus* group (Anura: Leptodactylidae). *Systematics and Biodiversity* 8:357-370.

Arriaga-Jaramillo, F.G., O.M. Cuellar-Valencia, I. García-Gómez, I. Ceballos-Castro, W. Bolívar-García, D.A. Velásquez-Trujillo, A.S. Ortiz-Baez & J.J. Ospina-Sarria. 2021. Acoustic segregation of five sympatric and syntopic species of genus *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from Western Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 1-8.

Bandelt, H., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48.

- Batista A., A. Hertz, G. Köhler, K. Mebert & M. Vesely. 2014. Morphological variation and phylogeography of frogs related to *Pristimantis caryophyllaceus* (Anura: Terrarana: Craugastoridae) in Panama. *Salamandra* 50:155-171.
- Bee, M.A. 2014. Social recognition in anurans. Pp. 169-221. En M.A. Bee & C. T. Miller (Eds.), *Psychological mechanisms in animal communication*. Springer, Switzerland.
- Bickford D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, et al. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22:148-155.
- Duarte-Marín, S., C. González-Acosta & F. Vargas-Salinas. 2018. Estructura y composición de ensamblajes de anfibios en tres tipos de hábitat en el Parque Nacional Natural Selva de Florencia, Cordillera Central de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 42:227-236.
- Duellman W.E. & L. Trueb. 1994. *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press, London.
- Duellman, W.E. & E. Lehr. 2009. *Terrestrial breeding frogs (Strabomantidae) in Peru*. NTV Science, Münster.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.
- Fouquet, A., A. Gilles, M. Vences, C. Marty, M. Blanc & N.J. Gemmell. 2007. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2:e1109.
- Frost, D.R. 2021. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. Version 6.0. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. [Consultado en junio 2021].
- Funk, W.C., M. Caminer & S.R. Ron. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:1806-1814.
- Gambale, P.G., L. Signorelli & R.P. Bastos. 2014. Individual variation in the advertisement calls of a Neotropical treefrog (*Scinax constrictus*). *Amphibia-Reptilia* 35:271-281.
- Gerhardt, H.C. 1994a. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 25:293-324.
- Gerhardt, H.C. 1994b. Reproductive character displacement of female mate choice in the grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Animal Behaviour* 47:959-969.
- Gerhardt, H.C. & F. Huber. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Frogs: Common Problems and Diverse Solutions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Glaw, F., J. Köhler, I. De la Riva, D.R. Vieites & M. Vences. 2010. Integrative taxonomy of Malagasy treefrogs: combination of molecular genetics, bioacoustics and comparative morphology reveals twelve additional species of *Boophis*. *Zootaxa* 2383:1-82.
- González-Durán, G., M. Targino, M. Rada & T. Grant. 2017. Phylogenetic relationships and morphology of the *Pristimantis leptolophus* species group (Amphibia: Anura: Brachycephaloidea), with the recognition of a new species group in *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870. *Zootaxa* 4243:042-074.
- Gonzalez-Voyer, A. & N. Kolm. 2011. Rates of phenotypic evolution of ecological characters and sexual traits during the Tanganyikan cichlid adaptive radiation. *Journal of Evolutionary Biology* 24:2378-2388.
- Grant T., D.R. Frost, J.P. Caldwell, R. Gagliardo, C.F.B. Haddad, P.J.R. Kok, D.B. Means, B.P. Noonan, W.E. Schargel & W.C. Wheeler. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 299:1-262.
- Günther, A.C.L.G. 1858. Neue Batrachier in der Sammlung des britischen Museums. *Archiv für Naturgeschichte*. Berlin 24: 319-328.
- Hedges S.B., W.E. Duellman & P. Heinicke. 2008. New world direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737:1-182.
- Hepp, F. & J. P. Jr. Pombal. 2019. Review of bioacoustical traits in the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae). *Zootaxa* 4766:599-600.



- Hoang D.T., O. Chernomor, A. von Haeseler, B.Q. Minh & L.S. Vinh. 2018. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35:518-22.
- Hutter, C.R. & J.M. Guayasamin. 2015. Cryptic diversity concealed in the Andean cloud forests: two new species of rainfrogs (*Pristimantis*) uncovered by molecular and bioacoustic data. *Neotropical Biodiversity* 1:35-59.
- Kalyaanamoorthy, S., B.Q. Minh, T.K.F. Wong, A. von Haeseler & L.S. Jermiin. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14:587-589.
- Katoh, S. & D.M. Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- Köhler, J., M. Jansen, A. Rodríguez, P.J.R. Kok, L.F. Toledo, M. Emmrich, F. Glaw, C.F.B. Haddad, M.O. Rödel & M. Vences. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods, and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251:1-124.
- Leigh, J. 2016. PopArt Version 1.7. <http://popart.otago.ac.nz>
- Lynch, J.D. 1981. Two new species of *Eleutherodactylus* from western Colombia (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 697:1-12.
- Lynch, J.D. 1998. New species of *Eleutherodactylus* from the Cordillera Occidental of western Colombia with a synopsis of the distributions of species in western Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 22:117-148.
- Lynch, J.D. & W.E. Duellman, 1997. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in western Ecuador: Systematics, Ecology, and Biogeography. *Natural History Museum University Kansas, Lawrence, Kansas*.
- Lyra, M.L., C.F.B. Haddad & A.M.L. Azeredo-Espin. 2017. Meeting the challenge of DNA barcoding amphibians from Neotropics: Polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources* 17:966-980.
- Marín, C., E. Cano, F. Castro, J. Lynch, M. Herrera & S.P. Galeano. 2017. *Pristimantis dorsopictus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017. [Consultado en agosto 10, 2021]
- NCBI. 1988. National Center for Biotechnology Information, [consultado en abril 15, 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nguyen, L.T., H.A. Schmidt, A. von Haeseler & B.Q. Minh. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32:268-274.
- Ortega-Andrade, H.M., O.R. Rojas-Soto, J.H. Valencia, A. Espinosa de los Monteros, J.J. Morrone, S.R. Ron & D.C. Cannatella. 2015. Insights from integrative systematics reveal cryptic diversity in *Pristimantis* frogs (Anura: Craugastoridae) from the Upper Amazon Basin. *PLoS One* 10:1-43.
- Padial, J.M. & I. De la Riva. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of Linnean Society* 155:97-122.
- Padial, J.M., J. Köhler, A. Muñoz & I. de la Riva. 2008. Assessing the taxonomic status of tropical frogs through bioacoustics: geographical variation in the advertisement calls in the *Eleutherodactylus discoidalis* species group (Anura). *Zoological Journal of the Linnean Society* 152:353-365.
- Padial, J.M., A. Miralles, I. De la Riva & M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7:1-14.
- Padial, J.M., T. Grant & D.R. Frost. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825:1-132.
- Páez, N.B. & S.R. Ron. 2019. Systematics of *Huicundomantis*, a new subgenus of *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) with extraordinary cryptic diversity and eleven new species. *ZooKeys* 868:1-112.
- Patiño-Ocampo, E., C. López-Murillo & M. Rivera-Correa. 2021. *Pristimantis dorsopictus* (Rivero y Serna, 1987). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* 7 (1):51-56
- Pough, F.H., R.M. Andrews, M.L. Crump, A.L. Savitzky, K.D. Wells & M.C. Brandley. 2016. *Herpetology*. Fourth edition. Sinauer Associates. New Jersey, USA.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. www.R-project.org. Vienna, Austria. [Consultado en junio 2021].



- Restrepo, A., J. Velasco & J.M. Daza. 2017. Extinction risk or lack of sampling in a threatened species: Genetic structure and environmental suitability of the Neotropical frog *Pristimantis penelopus* (Anura: Craugastoridae). *Papeis Avulsos de Zoologia* 57 (1):1-15.
- Ríos-Soto, J.A. & A.M. Ospina-L. 2018. The advertisement call of *Pristimantis boulengeri* (Lynch, 1981) from a population in the Central Andes of Colombia (Anura: Craugastoridae) (Craugastoridae). *Herpetology Notes* 11:719-723.
- Rivera-Correa, M. & J.M. Daza. 2016. Molecular phylogenetics of the *Pristimantis lacrimosus* species group (Anura: Craugastoridae) with the description of a new species from Colombia. *Acta Herpetologica* 11:31-45.
- Rivera-Correa, M., F. LaMadrid & A. Crawford. 2016. A new small golden frog of the genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from Andean cloud forest of Colombia. *Amphibia-Reptilia* 37:153-166.
- Rivera-Correa, M., C. Jiménez & J.M. Daza. 2017. Phylogenetic analysis of the Neotropical *Pristimantis leptolophus* species group (Anura: Craugastoridae): molecular approach and description of a new polymorphic species. *Zootaxa* 4242:313-343.
- Rivera-Correa, M. & J.M. Daza. 2020. Out of the blue: A new rain frog species of the genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from the northern Cordillera Central in Colombia. *Zootaxa* 4838:83-101.
- Rivera-Correa, M., G. González-Durán, A.M. Saldarriaga-Gómez & S. Duarte-Marín. 2021a. Biodiversity in the Andean Mountains: Two new rain frogs of genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) from northern Cordillera Central in Colombia. *Zootaxa* 5040:334-364.
- Rivera-Correa M., A. Ospina-L., M. Rojas-Montoya, K. Venegas-Valencia, L.A. Rueda-Solano, P.D.A. Gutiérrez-Cárdenas & F. Vargas-Salinas. 2021b. Cantos de las ranas y los sapos de Colombia: estado del conocimiento y perspectivas de investigación en ecoacústica. *Neotropical Biodiversity* 7:352-365.
- Rivero, J.A. & M.A. Serna. 1988 "1987". Tres nuevas especies de *Eleutherodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae) de Antioquia, Colombia. *Caribbean Journal of Science* 23:386-399.
- Rodríguez, A., Á. Dugo-Cota, S. Montero-Mendieta, A. Gonzalez-Voyer, R.A. Bosch, M. Vences & C. Vilà. 2017. Cryptic within cryptic: genetics, morphometrics, and bioacoustics delimitate a new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae) from Eastern Cuba. *Zootaxa* 4221:501-552.
- Ron, S.R., A. Merino-Viteri & D.A. Ortiz. 2021. Anfibios del Ecuador. Versión 2021.0. www.bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. [Consultado en junio 2021]
- Sánchez-Nivicela, J.C., V.L. Urgiles, J. Cedeño-Palacios, H. Abad-Peñafliel & J.M. Guayasamin. 2021. Una fantástica nueva especie del grupo *Pristimantis orcesi* de los Andes sur de Ecuador. *Neotropical Biodiversity* 6:224-237.
- Santos, J.C., L.A. Coloma & D.C. Cannatella. 2003. Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12792-12797.
- Schneider, H. & U. Sinsch. 2007. Contributions of bioacoustics to the taxonomy of the Anura. Pp: 2893-2933. En H. Heatwole & M. Tyler (Eds.). *Amphibian biology*. Surrey Beatty & Sons, Australia.
- Simões, P.I., Lima, A.P., W.E. Magnusson, W. Hödl, & A. Amézquita. 2008. Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: relationships with the upper Madeira river and other potential geological barriers. *Biotropica* 40: 607-614.
- Sueur, J., T. Aubin, C. Simonis, L. Lellouch, E.C. Brown, M. Depraetere, C. Desjonqueres, F. Fabianek, A. Gasc, E. Kasten, S. LaZerte, J. Lees, J. Marchal, A. Mikulec, S. Pavoine, D. Pinaud & A. Stotz. 2019. Package 'seewave' Version 2.1.4. www.cran.r-project.org/web/packages/seewave/seewave.pdf. [Consultado en junio 2021].
- Tabachnick, B.G. & L.S. Fidell, 1996. *Using Multivariate Statistics*. Harper Collins College, New York.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Vieites D.R., K.C. Wollenberg, F. Andreone, J. Köhler, F. Glaw & M. Vences. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:8267-8272.



Wägele, H., A. Klussmann-Kolb, M. Kuhlmann, G. Haszprunar, G. Lindberg, A. Koch & J.W. Wägele. 2011. The taxonomist - an endangered race. A practical proposal for its survival. *Frontiers in Zoology* 8:1-7.

Watters, J.L., Cummings, S.T., Flanagan, R.L. & C.D. Siler. 2016. Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa* 4072: 477-495.

Wells, K.D. 2007. The ecology and behavior of Amphibians. University of Chicago press, Chicago.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.



APÉNDICES

Appendix I. List of the specimens of *Pristimantis dorsopictus sensu lato* reviewed in this study and their localities of origin. MHUA: Museo de Herpetología Universidad de Antioquia; ARUQ: Colección de Anfibios y Reptiles de la Universidad del Quindío.

Apéndice I. Listado de los especímenes de *Pristimantis dorsopictus sensu lato* revisados en este estudio y sus localidades de origen. MHUA: Museo de Herpetología Universidad de Antioquia; ARUQ: Colección de Anfibios y Reptiles de la Universidad del Quindío.

Voucher	Municipio	Departamento	Longitud (N)	Latitud (W)	Elevación
MHUA-A 1217, 1225, 1228-29, 1283, 7454-55, 7569-71, 7638	Belmira	Antioquia	6.785	75.671	2800-3100
MHUA-A 12484-85	San Andrés de Cuerquía	Antioquia	6.92818	75.61732	2448
MHUA-A 9266	Santa Rosa de Osos	Antioquia	6.785	75.573	2680
MHUA-A 5855, 8960	Bello	Antioquia	6.354	75.641	2660
MHUA-A 6251, 7855-56	Medellín	Antioquia	6.211	75.489	2560-2610
MHUA-A 4139	El Retiro	Antioquia	6.137	75.552	2700
MHUA-A 6304-05, 9985, 10207, MHUA-A 12480, 12482-83 CSJ 4875-82, 4886-89, 4892-99	Sonsón	Antioquia	5.701	75.25	2700-3093
MHUA-A 12608-09, MHUA-A 12474-79	El Carmen de Viboral	Antioquia	5.964	75.285	2566-2650
ARUQ 760-61	Pensilvania	Caldas	5.478	75.11236	2067

Appendix II. Genbank (NCBI) accession numbers of 16S and COI mitochondrial DNA fragments used for phylogenetic analysis. Codes in bold correspond to new sequences generated in this study.

Apéndice II. Números de acceso a Genbank (NCBI) de los fragmentos de ADN mitocondrial 16S y COI usados para el análisis filogenético. Los códigos en negrita corresponden a secuencias nuevas generadas en este estudio.

ESPECIE	VOUCHER	16S	COI	ESPECIE	VOUCHER	16S	COI
<i>C. metriosistus</i>	AJC3873	KP149480	KP149268	<i>P. chocolatebari</i>	MHUA-L300-1	—	MZ928304
<i>P. acatallelus</i>	UVC15914	JN104675	JN371120	<i>P. chocolatebari</i>	MHUA-L300-2	—	MZ928303
<i>P. angustilineatus</i>	UVC15828	JN371034	JN371123	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA7455	KU724437	KU724446
<i>P. angustilineatus</i>	UVC15888	JN104677	JN371124	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA7638	KP082874	—
<i>P. angustilineatus</i>	UVC15941	JN371035	JN371125	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA7855	KU724438	KU724447
<i>P. boulengeri</i>	MHUA8951	KU724435	KU724444	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA7856	KU724439	KU724448
<i>P. boulengeri</i>	MHUA8952	KU724436	KU724445	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA8960	KU724440	—
<i>P. boulengeri</i>	ICN55788	KY494232	—	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12476	OL764392	OL809991
<i>P. brevifrons</i>	nrps0059	JN991433	—	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12478	OL764393	OL809993
<i>P. brevifrons</i>	UVC15825	JN104678	JN371051	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12479	—	OL809990
<i>P. brevifrons</i>	UVC15826	JN370960	JN371043	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12480	OL764394	OL809992
<i>P. brevifrons</i>	UVC15833	JN370967	JN371050	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12484	OL764396	OL809994
<i>P. brevifrons</i>	UVC15834	JN370962	JN371045	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12485	OL764397	OL809995
<i>P. brevifrons</i>	UVC15841	JN370969	JN371053	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12505	OL764395	—
<i>P. brevifrons</i>	UVC15852	JN370961	JN371044	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12608	—	OL809988
<i>P. brevifrons</i>	UVC15856	JN370957	JN371041	<i>P. cryptopictus</i>	MHUA12609	—	OL809989
<i>P. brevifrons</i>	UVC15858	JN370956	JN371040	<i>P. curtipes</i>	KU217871	EF493513	—
<i>P. brevifrons</i>	UVC15898	JN370959	JN371042	<i>P. devillei</i>	KU217991	EF493688	—
<i>P. brevifrons</i>	UVC15904	JN370973	JN371055	<i>P. dorsopictus</i>	ARUQ759	—	OL810007
<i>P. brevifrons</i>	UVC15908	JN370968	JN371052	<i>P. dorsopictus</i>	ARUQ760	—	OL810008
<i>P. brevifrons</i>	UVC15909	JN370963	JN371046	<i>P. dorsopictus</i>	MHUA10208	OL764389	OL809987
<i>P. brevifrons</i>	UVC15912	JN370970	JN371054	<i>P. dorsopictus</i>	MHUA12482	OL764390	OL809996
<i>P. buckleyi</i>	KU217836	EF493350	—	<i>P. dorsopictus</i>	MHUA12483	OL764391	OL809997
<i>P. celator</i>	KU177684	EF493685	—	<i>P. duellmani</i>	WED53050	AY326003	—
<i>P. chloronotus</i>	WED52959	AY326007	—	<i>P. eriphus</i>	QCAZ32705	EU186671	—
<i>P. chocolatebari</i>	MHUA12211	MZ905379	MZ928302	<i>P. festae</i>	QCAZ67550	MK829670	—
<i>P. chocolatebari</i>	MHUA12212	MZ905380	MZ928301	<i>P. gentryi</i>	KU218109	EF493511	—
<i>P. jubatus</i>	UVC15812	JN370993	—	<i>P. parectatus</i>	MRC1176	—	OL810000
<i>P. lasalleorum</i>	MHUA8710	KY627782	KY627811	<i>P. peraticus</i>	ICN55765	KY494228	—
<i>P. lasalleorum</i>	MHUA8711	KY627783	KY627812	<i>P. parectatus</i>	MHUA9977	KY627810	KY627828
<i>P. lasalleorum</i>	MHUA8735	—	KY627813	<i>P. parectatus</i>	ICN55762	KY494233	—
<i>P. lasalleorum</i>	MHUA8740	KY627786	KY627814	<i>P. peraticus</i>	WB1301	KY494224	—
<i>P. lasalleorum</i>	MHUA8758	KY627784	KY627815	<i>P. permixtus</i>	MHUA12258	—	MZ928297

Appendix II (Cont.). Genbank (NCBI) accession numbers of 16S and COI mitochondrial DNA fragments used for phylogenetic analysis. Codes in bold correspond to new sequences generated in this study.

Apéndice II (Cont.). Números de acceso a Genbank (NCBI) de los fragmentos de ADN mitocondrial 16S y COI usados para el análisis filogenético. Los códigos en negrita corresponden a secuencias nuevas generadas en este estudio.

ESPECIE	VOUCHER	16S	COI	ESPECIE	VOUCHER	16S	COI
<i>P. lasalleorum</i>	MHUA8768	KY627785	KY627816	<i>P. permixtus</i>	MHUA12259	—	MZ928298
<i>P. lasalleorum</i>	ICN55758	KY494221	—	<i>P. pyrrhomerus</i>	KU218030	EF49683	—
<i>P. leoni</i>	KU218227	EF493684	—	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA7222	KY627799	KY627829
<i>P. leopardus</i>	MHUA7585	KY627787	KY627817	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA7560	KY627800	KY627830
<i>P. leopardus</i>	MHUA7614	KY627790	KY627818	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA9873	KY627801	KY627831
<i>P. leopardus</i>	MHUA7616	KY627788	KY627819	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA9874	KY627802	KY627832
<i>P. leopardus</i>	MHUA7630	KY627789	KY627820	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA9875	KY627804	KY627833
<i>P. leopardus</i>	MHUA8858	KY627792	KY627820	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA9876	KY627803	KY627834
<i>P. leopardus</i>	MHUA9126	KY627791	KY627822	<i>P. scoloblepharus</i>	MHUA12343	—	OL810001
<i>P. leopardus</i>	ICN55756	KY494230	—	<i>P. scoloblepharus</i>	ICN55744	KY494229	—
<i>P. maculosus</i>	ICN55760	KY494240	—	<i>P. scoloblepharus</i>	ICN55768	KY494236	—
<i>P. myops</i>	UVC15824	JN104682	—	<i>P. sobetes</i>	MZUT1 558	KM675449	—
<i>P. myops</i>	UVC15934	JN371039	—	<i>P. supernatis</i>	WED52961	AY326005	—
<i>P. ocreatus</i>	KU208508	EF493682	—	<i>P. surdus</i>	KU177847	EF493687	—
<i>P. parectatus</i>	MHUA7564	KY627805	KY627823	<i>P. thymalopsoides</i>	KU177861	EF493514	—
<i>P. parectatus</i>	MHUA7594	KY627809	KY627824	<i>P. thymelensis</i>	WED53004	AY326009	—
<i>P. parectatus</i>	MHUA7627	KY627808	KY627825	<i>P. truebae</i>	KU218013	EF493512	—
<i>P. parectatus</i>	MHUA7633	KY627806	KY627826	<i>P. urani</i>	MHUA7467	KU724441	KU724449
<i>P. parectatus</i>	ICN55763	KY494222	—	<i>P. urani</i>	MHUA7471	KU724442	—
<i>P. parectatus</i>	MHUA9946	KY627807	KY627827	<i>P. urani</i>	MHUA7472	KU724443	KU724450
<i>P. parectatus</i>	MHUA12406	—	OL810002	<i>P. uranobates</i>	MHUA9866	KY627793	KY627835
<i>P. parectatus</i>	MRC1174	—	OL809999	<i>P. uranobates</i>	MHUA9867	KY627796	KY627836
<i>P. uranobates</i>	MHUA9868	KY627798	KY627837	<i>P. vertebralis</i>	KU177972	EF493689	—
<i>P. uranobates</i>	MHUA9869	—	KY627838	<i>P. aff. acatallelus</i>	MHUA12391	—	OL810003
<i>P. uranobates</i>	MHUA9870	KY627794	KY627839	<i>P. aff. acatallelus</i>	MHUA12392	—	OL810004
<i>P. uranobates</i>	MHUA9871	KY627797	KY627840	<i>P. aff. acatallelus</i>	MHUA12393	—	OL810006
<i>P. uranobates</i>	MHUA9872	KY627795	KY627841	<i>P. aff. acatallelus</i>	MHUA12394	—	OL810005
<i>P. uranobates</i>	ICN55771	KY494227	—	<i>P. aff. chocolatebari</i>	ARUQ1036	MZ905376	MZ928300
<i>P. uranobates</i>	ICN55787	KY494231	—	<i>P. aff. parectatus</i>	MHUA12506	—	OL809998
<i>P. quantus</i>	UVC15905	JN104684	—	<i>P. aff. permixtus</i>	MHUA12248	—	MZ928295
<i>P. quinquagesimus</i>	KU179374	EF493690	—	<i>P. aff. permixtus</i>	MHUA12249	—	MZ928294
<i>P. verecundus</i>	QCAZ12410	EF493686	—	<i>P. aff. permixtus</i>	MHUA12250	—	MZ928296

Appendix III. Material evaluated from scientific collections.

Apéndice III. Material evaluado de colecciones científicas.

Pristimantis angustilineatus: El Boquerón, vereda Las Amarillas, Municipio de El Cairo, Departamento del Valle del Cauca, Colombia (ICN 39598, holotype); Vereda Las Amarillas, Municipio de El Cairo, Departamento del Valle del Cauca, Colombia (ICN 29281, 29286, 39598, 39601, 39611); Finca La Primavera, Vereda La Mesenia, Municipio de Jardín, Departamento de Antioquia, Colombia (MHUA-A 4450–4452).

Pristimantis baiotis: Municipio de Frontino, Antioquia, Colombia (ICN 16831); Municipio de Urrao, Antioquia, Colombia (ICN 19181).

Pristimantis boulengeri: Finca La Samaria, corregimiento San Félix, Salamina, Caldas, Colombia (MHUA-A 6308–6310); Reserva Natural Navarco, Alto de la Línea, Calarca, Quindío (MHUA-A 06312–6314); Parque Nacional Los Nevados, Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia (MHUA-A 6363, 6365); Refugio Ecológico

La Pastora (4,707971 N, 75,492928 W), Parque Regional Natural Ucumarí, Pereira, Risaralda, Colombia (MHUA-A 8951, 8952); Sector Guala, Cajamarca, Tolima, Colombia (MHUA-A 10850, 10880, 10884, 10889, 10892, 10896, 10899, 10904).

Pristimantis dorsopictus: Entre los municipios de Sonsón y Nariño, Antioquia CSJ1520–1532, 1535, 1537, 1548–1553, 1560–1566; Parque Nacional Natural Selva de Florencia, Municipio de Pensilvania, Caldas (ARUQ-759, 760, 811).

Pristimantis brevifrons: Vereda Las Amarillas, El Cairo, Valle del Cauca (ICN 29269–29270); Vereda La Romelia, El Tambo, Cauca, Colombia (MHUA-A 6966, 6967).

Pristimantis urani: Vereda El Maravillo (6,51008 N, 74,144452 W), Corregimiento La Encarnación, Urrao, Antioquia, Colombia (MHUA-A 7467, 7468, 7469, 7470, 7471, 7472).

Pristimantis myops: Sector Guala (4,74162 N, 76,29614 W), El Cairo, Valle del Cauca, Colombia (MHUA-A 9293).

Appendix IV. Genetic distances in percentage for species of the *Pristimantis boulengeri* group from 630 bases of the COI region. Italicized numbers on the diagonal indicate intraspecific genetic diversity. *Clade 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clade 2 = *P. dorsopictus* (see text).

Apéndice IV. Distancias genéticas en porcentaje para las especies del grupo *Pristimantis boulengeri* a partir de 630 bases de la región COI. Los números en cursiva en la diagonal indican la diversidad genética intraespecífica. *Clado 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clado 2 = *P. dorsopictus* (ver texto).

Distancias Genéticas		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>P. angustilineatus</i> (n = 3)	0							
2	<i>P. boulengeri</i> (n = 2)	9.2–9.4	0.2						
3	<i>P. brevifrons</i> (n = 12)	10.8–11.8	7.1–8.9	0.0–5.0					
4	<i>P. cryptopictus</i> * sp. nov. (n = 13)	10.0–11.4	8.7–9.2	9.4–11.9	0.0–6.6				
5	<i>P. dorsopictus</i> * (n = 4)	13.9–14.5	9.7–10.5	7.3–9.1	12.8–14.9	0.0–0.9			
6	<i>P. myops</i> (n = 2)	15.4	14.3–14.6	15.7–18.7	15.4–18.6	15.7–16.6	0		
7	<i>P. urani</i> (n = 3)	10.8	11.1	11.0–11.6	11.4–12.7	11.9–12.2	18.3	0	
8	<i>P. quantus</i> (n = 1)	19.6	20.6–20.9	17.5–18.1	19.9–20.6	18.1–18.4	17.5	16.7	–

Appendix V. Genetic distances in percentage for species of the *Pristimantis boulengeri* group from 565 bases of the 16S region. Numbers in italics on the diagonal indicate intraspecific genetic diversity. *Clade 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clade 2 = *P. dorsopictus* (see text).

Apéndice V. Distancias genéticas en porcentaje para las especies del grupo *Pristimantis boulengeri* a partir 565 bases de la región 16S. Los números en cursiva en la diagonal indican la diversidad genética intraespecífica. *Clade 1 = *P. cryptopictus* sp. nov.; *Clade 2 = *P. dorsopictus* (see text).

Distancias Genéticas		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>P. angustilineatus</i> (n = 3)	<i>0-0.4</i>							
2	<i>P. boulengeri</i> (n = 3)	8.2-8.7	<i>0.0</i>						
3	<i>P. brevifrons</i> (n = 12)	5.4-6.8	6.3-7.2	<i>0.0-1.7</i>					
4	<i>P. cryptopictus</i> * sp. nov. (n = 9)	4.9-7.8	3.0-4.4	5.8-6.3	<i>0.0-2.2</i>				
5	<i>P. dorsopictus</i> * (n = 2)	4.9-5.4	4.9	4.0-4.9	4.0-4.4	<i>0-0.4</i>			
6	<i>P. myops</i> (n = 2)	7.3-7.7	7.7	6.3-8.2	6.3-7.7	6.8	<i>0.0</i>		
7	<i>P. urani</i> (n = 3)	3.5-4.0	5.3	4.4-5.4	3.1	3.5-4.4	7.3	<i>0.0</i>	
8	<i>P. quantus</i> (n = 1)	6.3-6.8	5.3	5.8-6.3	3.5-4.9	4.0	7.3	5.4	-